

Die Lipoproteinelektrophorese in der Diagnostik von Störungen des Fettstoffwechsels

Ein Methodenvergleich anhand der Literatur

Annemarie Trost

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Med. Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Schwiegk

Die Lipoproteinelektrophorese in der Diagnostik von
Störungen des Fettstoffwechsels - Ein Methodenvergleich
anhand der Literatur.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Annemarie Trost

aus

Esslingen

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Herr Privatdozent Dr. med. Schwandt

Mitberichterstatter: Herr Professor Dr. med. Schwiegk

Dekan: Herr Professor Dr. med. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1974



Meinen Eltern gewidmet

Gliederung:

- 1.1. Aufbau und Eigenschaften der Lipoproteine
 - 1.1.1. Einteilung der Lipoproteine
 - 1.1.2. Aufgabe der Lipoproteine
- 1.2. Typeneinteilung der Hyperlipoproteinämien
 - 1.2.1. Sekundäre Hyperlipoproteinämien
 - 1.2.2. Primäre Hyperlipoproteinämien
- 1.3. Bedeutung der Lipoproteinelektrophorese

Fragestellung

- 2. Lipoproteinelektrophorese auf Papier
 - 2.1. Bedingungen
 - 2.1.1. Vertikale oder horizontale Elektrophorese
 - 2.1.2. Vorreinigung des Filterpapiers
 - 2.1.3. Einfluß der Puffers auf die Wanderungsgeschwindigkeit
 - 2.1.3.1. Einfluß des Puffers auf die Trennschärfe
 - 2.1.3.2. Einfluß von Albumin im Puffer auf die Trennschärfe
 - 2.1.4. Färbung der Lipoproteine
 - 2.1.4.1. Sudanschwarz B als Mittel für die Vorfärbung
 - 2.1.5. Entfärben des Hintergrunds
 - 2.1.6. Trocknen der Papierstreifen
 - 2.1.7. Serummenge
 - 2.1.8. Auswertung
 - 2.2. Empfehlungen für die Lipoproteinelektrophorese auf Papier
 - 2.3. Nachteile der Lipoproteinelektrophorese auf Papier
 - 2.4. Vorteile der Lipoproteinelektrophorese auf Papier
- 3. Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat
 - 3.1. Arbeitsgänge
 - 3.2. Bedingungen
 - 3.2.1. Einfluß der Pufferkonzentration auf die Trennschärfe
 - 3.2.2. Färbung

- 3.2.2.1. Gegenüberstellung der zwei Färbemethoden
- 3.2.2.2. Andere Farbstoffe
- 3.2.3. Transparenzverfahren
- 3.2.4. Serummengen
- 3.2.5. Methoden für die Serumapplikation
- 3.2.6. Densitometrische Auswertung
- 3.3. Vorteile der Celluloseacetatelektrophorese
- 3.4. Nachteile der Celluloseacetatelektrophorese

4. Agarose - Gel - Elektrophorese
 - 4.1. Arbeitsgänge
 - 4.2. Bedingungen
 - 4.2.1. Konstante Stromstärke oder konstante Spannung
 - 4.2.2. Probenbereitung
 - 4.2.3. Rillen für die Proben
 - 4.2.3.1. Größe der Rillen
 - 4.2.4. Vorfärbemethode
 - 4.3. Auswertung
 - 4.4. Einfluß der Konzentration der Agarose auf die Trennschärfe
 - 4.5. Vorteile der Agaroseelektrophorese

5. Disk - Elektrophorese
 - 5.1. Bedingungen
 - 5.1.1. Gele
 - 5.1.1.1. Das kleinporige Gel
 - 5.1.1.2. Das großporige Gel
 - 5.1.2. Polymerisationsmethoden
 - 5.1.3. Pufferlösungen
 - 5.1.4. Elektrophoresezeit, Spannung, Stromstärke
 - 5.1.5. Bereitung der Probe bzw des Probengels
 - 5.1.6. Elektrophoresegeräte
 - 5.2. Arbeitsgänge
 - 5.2.1. Reinigen der Röhrchen
 - 5.2.2. Entfernen der Gele aus den Röhrchen
 - 5.3. Härten eines 3% igen Gels
 - 5.4. Ammoniumpersulfat und Sudanschwarz
 - 5.5. Lagerung von Separating-Gelen
 - 5.6. Toxizität des Acrylamids
 - 5.7. Auftrennung der Lipoproteine

- 5.8. Auswertung
- 5.9. Empfindlichkeit der Methode
- 5.10. Zwischenbanden
- 5.11. Vorteile der Disk-Elektrophorese
- 5.12. Nachteile der Disk-Elektrophorese
- 5.13. Empfehlung

- 5.14. Differenzierung von Typ III
- 5.15. Unterscheidung zwischen Typ II und Typ IV

- 6. Lagerung der Seren
 - 6.1 Veränderung der Lipoproteine bei Zimmertemperatur
 - 6.2 Veränderung bei Aufbewahrung bei 2°-4°C
 - 6.3 Veränderung durch einen Frierprozess
 - 6.4 Art der Veränderung
 - 6.5 Substanzen, die die Stabilität erhöhen
 - 6.6 Diskussion
 - 6.7 Schlußfolgerung

- 7. Eigene Untersuchungen
 - 7.1 Einleitung
 - 7.2 Fragestellung
 - 7.3 Methodik
 - 7.3.1 Seren
 - 7.3.2 Herstellung der Gele
 - 7.3.3 Auftragen der Probe
 - 7.3.4 Vorbereitung zur Elektrophorese
 - 7.3.5 Elektrophorese
 - 7.3.6 Fixierung
 - 7.3.7 Trocknen der Gele
 - 7.3.8 Färbung
 - 7.3.9 Herstellung der Farblösung
 - 7.3.10 Entfärben des Hintergrunds
 - 7.3.11 Trocknen der Objektträger
 - 7.3.12 Waschung von Rinderalbumin nach Campbell
 - 7.3.13 Säulenchromatographische Befreiung der Freien Fettsäuren vom Rinderalbumin mit Amberlite G 400 II

- 7.3.14. Herstellung des albuminhaltigen Gels
- 7.3.15. Herstellung von verdünntem Gel
- 7.3.16. Herstellung der Kühlung
- 7.4. Bestimmung der Freien Fettsäuren in einer
1 % igen Rinderalbuminlösung
- 7.5. Diskussion
- 7.6. Zusammenfassung

- 8 Diskussion
- 8.1. Methoden, die eine verhältnismäßig kurze
Einarbeitungszeit erfordern.
- 8.2. Methoden, die einen möglichst geringen
Arbeitsaufwand erfordern.
- 8.3. Methoden, die möglichst wenig Neuanschaffungen
an Geräten erfordern.
- 8.4. Methoden, bei denen die Lipoproteinemuster
leicht archiviert werden können.
- 8.5. Methoden, die eine gute Trennung der β -
- und der prae- β -Bande ermöglichen.

Tabellen (siehe Tabellenverzeichnis nächste
Seite)

Lebenslauf

Literaturverzeichnis

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1	:	Lipoproteine des menschlichen Serums
Tabelle 2	:	Sekundäre Hyperlipoproteinämien
Tabelle 3	:	Laufzeiten, Spannungen, Stromstärken, Elektrophoresegeräte
Tabelle 4	:	Vergleichbare Filterpapiere
Tabelle 5	:	Pufferlösungen
Tabelle 6	:	Farblösungen
Tabelle 7	:	Vergleichbare CAF-Folien
Tabelle 8	:	Agarose
Tabelle 9	:	Herstellung der Gele
Tabelle 10	:	Probenbereitung
Tabelle 11	:	Fixierung
Tabelle 12	:	Trockenzeiten und Temperaturen
Tabelle 13	:	Elektrophoresezeit, Spannung, Stromstärke
Tabelle 14	:	Elektrophoresegeräte
Tabelle 15	:	Bereitung der Probe bzw. des Probengels
Tabelle 16	:	Ergebnisse

1.1. Aufbau und Eigenschaften der Lipoproteine:

Bei den Lipoproteinen handelt es sich um komplizierte Fett-Eiweiß-Komplexe, die die Transportform der Lipide im Serum darstellen.

Aufgrund ihres Eiweißanteils verhalten sie sich wie Proteine. Sie sind wasserlöslich, haben einen amphoteren Charakter, wandern im elektrischen Feld und lassen sich mit der Ultrazentrifuge trennen.

Der Proteinanteil läßt sich in drei verschiedene Apolipoproteine unterteilen, deren genaue Zusammensetzung in den letzten Jahren genau aufgeklärt werden konnte. Man unterscheidet ein Apolipoprotein A, ein Apolipoprotein B und ein Apolipoprotein C.

Das Apolipoprotein A (ApoA)- auch HD-Apolipoprotein genannt - besteht aus zwei verschiedenen Proteinen, dem A I - und dem A II - Protein. Beide Proteine besitzen als C - terminale Aminosäure Glutamin. A I - Protein zeigt Asparaginsäure als N-terminale Aminosäure, während beim A II - Protein die N-terminale Aminosäure blockiert ist.⁽⁸³⁾

Apolipoprotein B (Apo B), auch LD- Apolipoprotein genannt, besitzt an seinem N-terminalen Ende auch Glutaminsäure und an seinem C-terminalen Ende Serin^(50,51). Das Apolipoprotein C (Apo C) stellt ein Gemisch aus 3 nicht identischen Proteinketten dar, die durch Serin und Threonin als N-terminale Aminosäuren ausgezeichnet sind.⁽⁸³⁾ Wir unterscheiden C I, C II, C III. Das Apo - C I besitzt Serin, das Apo - C II Glutaminsäure und das Apo - C III Alanin als C - terminale Aminosäure.

Wegen des hohen Lipidanteils besitzen die Lipoproteine eine geringe Dichte und steigen beim Ultrazentrifugieren in z.B. 1 molarer Na-Cl oder Na-Br-Lösung an die Oberfläche. Diesen Vorgang bezeichnet

man als Flotation. Die meisten Lipoproteine werden in der Leber, ein geringer Teil wird möglicherweise noch im Dünndarm gebildet. Die Chylomikronen werden ausschließlich im Darm gebildet.

1.1.1.Einteilung der Lipoproteine:

Es lassen sich vier verschiedene Lipoprotein-
gruppen unterscheiden: alpha (high-density) - ,
beta (low density) -, prae-beta (very low-density) -
- Lipoproteine und Chylomikronen.
(siehe Tabelle 1)

a. Chylomikronen: Sie dienen als Vehikel der Nahrungs-
triglyzeride und haben bei der Ultrazentrifugation
eine Dichte kleiner als 1,006 g/ml. Ihr Durchmesser
liegt zwischen 0,1 und 5 Mikron, wobei die größten
Teilchen Aggregate darstellen dürften. Als einzige
Lipoproteinfraktion bleiben sie bei der Papier- und
Agaroseelektrophorese an der Auftragsstelle liegen.
Ihr Proteingehalt, der sich aus Apo A,B und C zusam-
mensetzt, ist niedrig. Die Flotationskonstante s_f
liegt zwischen 400 und 40 000.

b. Die Prae-beta-Lipoproteine (VLDL) mit einer Flo-
tationskonstanten s_f von 20 bis 400 sind Vehikel der
endogenen, also der in der Leber synthetisierten
Triglyzeride. In der Ultrazentrifuge finden sie sich
bei einer Dichte von weniger als 1,006 g/ml. Ihr
Proteinanteil besteht aus Apo A, Apo B und Apo C-
-Protein. Der Moleküldurchmesser beträgt 300-400 Å,
das Molekulargewicht $15 \cdot 10^6$ (69,87)

c. Die β -Lipoproteine (LDL) sind die Fraktion mit
dem höchsten Cholesteringehalt. Sie lassen sich in

der Ultrazentrifuge im Dichtebereich zwischen 1,006 und 1,063 g/ml isolieren, haben einen Moleküldurchmesser von 200 Å, ein Molekulargewicht von $3,2 \cdot 10^6$ und eine Flotationskonstante zwischen s_f 0 und 20.

Der Proteinanteil dieser Fraktion besteht hauptsächlich aus Apo B.

d. Die alpha-Lipoproteine besitzen eine Dichte von 1,063 bis 1,210 g/ml. Der Moleküldurchmesser beträgt 70-100 Å, das Molekulargewicht liegt zwischen $17 \cdot 10^4$ und $44 \cdot 10^4$. Der Proteinanteil dieser Fraktion besteht hauptsächlich aus Apo A.

1.1.2. Aufgabe der Lipoproteine:

Lipoproteine ermöglichen einerseits durch ihre Löslichkeit im Blutplasma und andererseits durch ihre besondere Bindungskapazität für wasserunlösliche Fette und Lipide, wie z.B. Cholesterin, Triglyzeride, Phosphatide, Steroide und fettlösliche Vitamine, deren Transport im wässrigen Milieu. Erst dadurch werden spezifische Stoffwechselreaktionen dieser Lipide möglich gemacht.

So finden sich unmittelbar nach einer fetthaltigen Mahlzeit physiologischerweise Chylomikronen im Blut, die die lipämische Trübung hervorrufen. Einige Stunden später lassen sich dann die sekundären Partikel im Blut nachweisen, bei denen es sich um die prae- β -Lipoproteine handelt, die die aus Kohlenhydraten synthetisierten Triglyzeride transportieren.

Aus dieser physiologischen Resorptionshyperlipämie ergibt sich die Forderung, daß Lipidanalysen nur im 12-Stunden-Nüchternserum durchgeführt werden sollten.

Störungen des Fetttransports können bei einem Mangel an Lipoproteinen auftreten, wie bei den seltenen Formen der A-~~B~~-Lipoproteinämie oder der als

Tangier-Disease bekannten Hypo-alpha-Lipoproteinämie. Die verschiedenen Formen von Hyperlipidämie sind jedoch viel häufiger.⁽²⁸⁾

1.2. Typeneinteilung der Hyperlipoproteinämien:

Man unterscheidet sekundäre (siehe Tabelle 2), symptomatische Hyperlipoproteinämien von primären, essentiellen Hyperlipoproteinämien.

1.2.2. Primäre Hyperlipoproteinämien:

Die primäre, familiär auftretende Hyperlipoproteinämie wurde früher in eine essentielle Hypercholesterinämie, eine Hyperlipämie und eine Mischhyperlipämie eingeteilt, wobei Ahrens⁽²⁾ auf das Vorkommen einer nicht nur fett- sondern auch kohlehydratinduzierten Hyperlipidämie hingewiesen hat. 1965 gelang Fredrickson⁽³¹⁾ mit Hilfe einer verbesserten Lipoproteinelektrophorese-technik auf Papier eine differenzierte Einteilung der genetisch bedingten Hyperlipidämien in 5 verschiedene Typen:

Typ I

Diese Krankheit, die 1932 zuerst von Bürger und Grütz⁽⁵⁾ entdeckt wurde, ist die seltenste Hyperlipoproteinämie. Bisher wurden nur ca 50 genau untersuchte Fälle beschrieben⁽⁵⁵⁾.

Es ist eine fettinduzierte, exogene Hyperlipoproteinämie, die autosomal-rezessiv vererbt wird und fast immer im Kindesalter diagnostiziert wird.

Als Krankheitsursache wird eine Störung des Lipoproteinlipasesystems (Mangel oder völliges Fehlen von Postheparin- Triglyzeridlipase) verantwortlich gemacht.

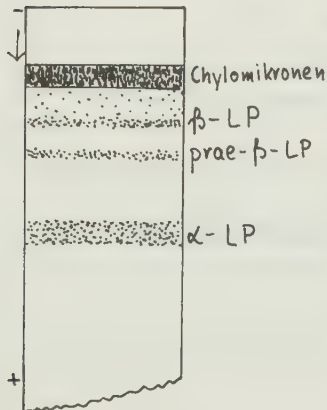
So führt bereits eine einmalige Fettzufuhr zu einer tagelang andauernden Serumtrübung infolge der Streuung des Lichts durch die vermehrten Chylomikronen.

Die Symptome (Augenhintergrundsveränderungen, eruptive Xanthome der Haut, Hepatosplenomegalie und abdominelle Krisen, welche wegen ihres anfallsweisen Auftretens und kolikartigen Charakters den Patienten häufig mit einem akuten Abdomen zum Chirurgen führen) treten vor dem 10. Lebensjahr auf.

zur Stellung der Diagnose einer hereditären Hyperlipoproteinämie Typ I sind erforderlich:

1. Das typische Lipoproteinemuster, das eine deutliche Chylomikronenbande aufweist.
2. Der Nachweis des Lipoproteinlipasemangels im Plasma oder Fettgewebe.
3. Ausschluß verschiedener sekundärer Hyperlipoproteinämien mit ähnlichem Muster.
4. Familienuntersuchungen.

Die Therapie besteht in einer extrem fettarmen (weniger als 25-30 g pro Tag) Kost. Triglyceride mittelkettiger Fettsäuren, die nicht in Form von Chylomikronen, sondern direkt über den Pfortaderkreislauf die Leber erreichen, können ohne Berechnung verwendet werden. (z.B. Ceres)⁽⁸¹⁾



Laborbefunde:

1. Cholesterin normal oder erhöht
2. Post-Heparin lipolytische Aktivität (PHLA): niedrig
3. Triglyceride erhöht
4. Fett-Belastungstest: stark verändert

Klinische Befunde:

1. Plasma: Milchig-sahnig
2. Hepato-Splenomegalie; Schmerzen im Abdomen;

eruptive Xanthome;
Lipämia retinalis.

3. Gewöhnlich familiärer
Befall und erkennbar
in der Kindheit.

Typ II

Diese Krankheit, die bedrohlichste aller Hyperlipidämien ist relativ häufig. Die familiäre Erkrankung wird dominant vererbt.

Noch ungeklärt ist die Pathogenese dieser Erkrankung. Es wird sowohl eine Abbaustörung des Cholesterins oder des Proteinanteils der β -Lipoproteine als auch eine vermehrte Cholesterinsynthese in Erwägung gezogen.

Charakteristisch sind Sehnen- und Hautxanthome, Xanthelasma, Arcus corneae juvenilis und eine früh einsetzende Koronarsklerose. Häufig führen Koronarinsuffizienz und andere arterielle Durchblutungsstörungen zum Erkennen der Krankheit. Beim Homozygoten wurden bereits im Kindesalter Herzinfarkte beschrieben.

Der Typ II läßt sich in 2 Unter-Typen aufgliedern: Den Typ IIa und den Typ IIb.

Beim Typ IIa sind nur die β -Lipoproteine, beim Typ IIb die β - und die prae- β -Lipoproteine erhöht⁽³⁶⁾

Die Diagnose der hereditären Form beruht:

1. auf dem typischen Lipoproteinemuster
2. Erhöhung des Cholesterins, besonders stark bei den Homozygoten.
3. der häufig zu beobachtenden Xanthomatose, die jedoch durchaus fehlen kann.
4. einem erkrankten Elternteil, Geschwister oder Kind.

Die Therapie, die wegen der erheblichen Gefährdung der Patienten so früh wie möglich zu erfolgen hat, besteht in diätischen und medikamentösen Maßnahmen.

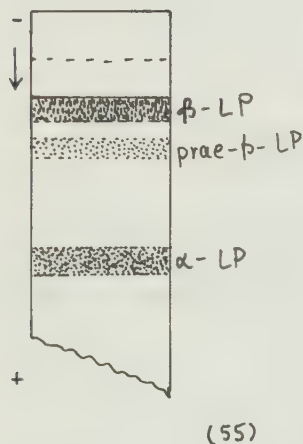
Bei der Diät werden die Triglyzeride gesättigter (im allgemeinen tierischer) Fette durch solche mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (linolsäurereiche Öle und Fette pflanzlichen Ursprungs) ersetzt. Gleichzeitig soll die tägliche Cholesterinzufuhr 300 mg nicht überschreiten. An cholesterinsenkenden Medikamenten stehen das Cholestyramin (16-24 g pro Tag), die Nikotinsäure (3 und mehr g pro Tag), Nikotinsäurederivate in Depotform und D-Thyroxin-Präparate zur Verfügung. Häufig sind die Homozygoten vom Typ II außerordentlich therapieresistent.

Laborbefunde:

1. Cholesterin erhöht
2. Triglyzeride normal oder erhöht
3. PHLA: normal
4. Glucose- und Fettbelastungstest: gewöhnlich normal

Klinische Befunde:

1. Plasma: klar
2. Xanthomatosis: Tendinöse und tuberöse Xanthomata; Xanthelasmen; Arcus corneae
3. Bei familiärem Befall erkennbar in der Kindheit
4. Frühzeitige Arteriosklerose



Typ III

Erst in den letzten Jahren wurde aus der Gruppe der essentiellen Hyperlipoproteinämien dieses Krankheitsbild als Eigenständiges erkannt.

Die Differenzierung des Typs III verlangt ein Speziallabor. Das liegt an den ausgefallenen phys.-chem. Eigenschaften der sog. "floating-B" Fraktion dieses Typs.

Diese Fraktion flotierte in der Ultrazentrifuge bei einer Dichte von $d=1,006$ g/ml, besitzt aber nicht wie alle anderen VLDL eine prae- β Mobilität, sondern eine β -Mobilität entsprechend der LDL-Lipoproteine.

Diese β -Lipoproteine weisen einen überdurchschnittlich hohen Gehalt an Triglyzeriden auf. Die Serumtriglyzeridkonzentration ist auf 400-700 mg% und die Cholesterinkonzentration auf 400-800 mg% erhöht.

Das Plasma kann klar, trüb oder milchig aussehen.

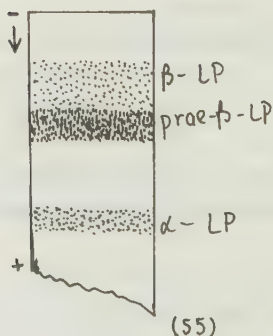
Für die Krankheit nimmt man einen autosomal-rezessiven Vererbungsgang an. Häufig treten im 4. Lebensjahrzehnt tuberoeruptive Xanthome am den Ellenbogen, an den Knien und in der Glutealregion auf. Außer tendinösen

Xanthomen beobachtet man spezifische orange-gelbe Lipidablagerungen in den Falten der Handinnenfläche.

(palmare Xanthome) Die Komplikationsrate vonseiten der Arteriosklerose ist bei diesem Typ ausgesprochen hoch. Häufig bestehen Kohlenhydrat-Intoleranz und Hyperurikämie.

Die Diagnosestellung erfordert derzeit noch aufwendige Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge, jedoch werden zur Zeit immunologische Methoden entwickelt, die geringeren Aufwand erfordern.

Grundlage der diätischen Behandlung dieses Kohlenhydrat-induzierten Typs ist eine kalorisch knappe, kohlenhydrat- und cholesterinarme Kost. Als Medikament kommt Clofibrat (1,5-2mg/Tag) in Frage.



Laborbefunde:

1. Cholesterin erhöht
2. Triglyzeride erhöht
3. PHLA: Normal
4. Glukose-Belastungstest:
oft pathologisch
5. Fett-Belastungstest:
mäßig verändert
6. Durch Kohlenhydratzufuhr
oft induzierbar

Klinische Befunde:

1. Plasma klar bis milchig trüb
2. Xanthome: Plane, tuberös-
eruptive und tendinöse
Xanthome; Arcus corneae
3. Gewöhnlich familiär und er-
kennbar im Erwachsenenalter
4. Frühzeitige Arteriosklerose

Typ IV

Dieses Krankheitsbild, das sich durch eine erhöhte Konzentration der prae- β Lipoproteine auszeichnet, ist am häufigsten unter der Gruppe der Hyperlipoproteinämien anzutreffen. Das Gleichgewicht von Synthese und Elimination der endogenen Triglyzeride ist gestört, und zwar in der Art, daß die Plasmatriglyzeride erhöht sind.

Die Plasmacholesterinwerte sind normal oder erhöht.

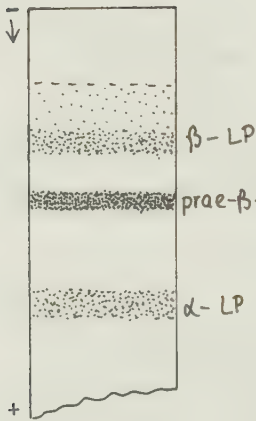
Je nach der prae- β -Lipoproteinkonzentration ist das Plasma trüb oder milchig.

Nur 5 % der Kinder, von denen ein Elternteil an dieser Krankheit leidet, erkranken vor dem 20. Lebensjahr, 50 % vor dem 30. Lebensjahr.

Bei einer Triglyzeridkonzentration von 1000-2000 mg% entwickeln sich eruptive Xanthome und eine lipaemia retinalis. Gelegentlich besteht eine leichte Hepatosplenomegalie. Außerdem entwickelt sich vorzeitig eine Koronarsklerose. 70 % der Patienten haben eine diabetische Stoffwechsellage, 40 % eine Hyperurikämie, 60 % reagieren auf eine kohlenhydratreiche Kost mit einem Anstieg der endogenen Triglyzeride⁽⁵⁵⁾.

Die Therapiemaßnahmen erstrecken sich auf eine kohlenhydratarme Diät, Clofibrat und Nikotinsäurepräparate. Bei Übergewicht ist eine Reduktion des Körpergewichtes zu empfehlen.

Laborbefunde:



(55)

1. Cholesterin normal oder erhöht
2. Triglyzeride erhöht
3. PHLA: Normal
4. Glucose- und Fettbelastungstest im allgemeinen pathologisch
5. Gewöhnlich durch Kohlehydratzufuhr induzierbar

Klinische Befunde:

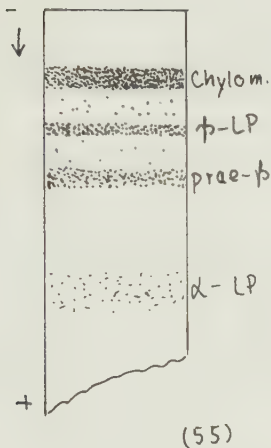
1. Plasma klar bis milchig trüb
2. Vereinzelt eruptive Xanthome und Hepato-Splenomegalie
3. Oft familiär und gewöhnlich erkennbar im Erwachsenenalter
4. Arteriosklerose häufig

Typ V:

Bei dieser Form sind im Lipoproteinmuster sowohl Chylomikronen, als auch eine Vermehrung der prae- β -Lipoproteine nachzuweisen. Die fett- und kohlehydrat-induzierte Hypertriglyzeridämie kann bei Normaldiät Werte von 1 500-5000 mg% erreichen.

Wie Typ IV, tritt der Typ V erst im 2. und 3. Lebensjahrzehnt in Erscheinung. Weitere Symptome können sein: Pathologische Glukosetoleranz, Hyperurikämie, Abdominalkoliken, Lipämia retinalis, eruptive Xanthome und Hepato-splenomegalie. Die Behandlung besteht in einer Gewichtsreduktion auf das Normalgewicht, bei Abdominalkoliken in Nulldiät. Kohlenhydratarme Diät, deren Fettanteil fast vollständig aus MCT-Fetten bestehen sollte, ist indiziert. Eine zusätzliche Gabe von Nikotinsäurepräparaten oder Clofibrat kann erfolgen.

Laborbefunde:



1. Cholesterin erhöht
2. Triglyzeride erhöht
3. PHLA: Niedrig oder normal
4. Glukose-und Fettbelastungs-
test im allgemeinen pathologisch
5. Gewöhnlich durch Kohlehydratzu-
fuhr induzierbar

Klinische Befunde:

1. Plasma: Milchig-sahnig
2. Schmerzen im Abdomen;
eruptive Xanthome;
Hepatosplenomegalie;
Lipaemia retinalis;
3. Bei familiärem Befall ge-
wöhnlich erst erkennbar im
Erwachsenenalter

1.3. Bedeutung der Lipoproteinelektrophorese:

Hyperlipidämien sind sehr häufig. So fand Hartmann in einer Basler Studie bei 3 000 Angestellten der Chem. Industrie und bei einem größeren Spitalkollektiv trotz hoch angesetzter Normwerte in etwa 12 % aller Fälle erhöhte Lipidwerte.⁽³⁹⁾ Schettler gab für die BRD eine Häufigkeit von 10 % in der Gesamtbevölkerung an.⁽³⁷⁾

Da ein erhöhter Blutlipidgehalt allgemein als arteriogener Risikofaktor anerkannt ist, sollten die Serumlipidbestimmungen routinemäßig durchgeführt werden, besonders bei Personen, die in der Eigen- oder Familienanamnese Risikofaktoren oder Manifestationen der Arteriosklerose aufweisen.

Je frühzeitiger eine Hyperlipidämie diagnostiziert und

behandelt wird, desto effektiver ist die Prophylaxe der Arteriosklerose und ihrer Komplikationen, die in allen westlichen Ländern an der Spitze der Mortalitätsstatistik steht und die ständig weiter rasch zunimmt.

Neben der mehrfach zu fordernden simultanen Bestimmung von Triglyzeriden und Cholesterin im Serum gibt die qualitative gleichzeitige Beurteilung des Lipoproteinmusters entscheidende diagnostische und therapeutische Aussagen:

Die Typendiagnostik führt nicht nur zu einer Einordnung der primären Hyperlipoproteinämien, und Diagnostik ihrer jeweiligen Komplikationen, sondern auch zur Erkennung der sekundären Hyperlipidämien, die ebenfalls durch ein typisches Lipoproteinmuster weitgehend charakterisiert sind.

Therapeutisch ergeben sich eindeutige Konsequenzen: so verlangt der Nachweis von Chylomikronen eine fettarme Diät, das vermehrte Auftreten von prae- β Lipoproteinen eine kohlenhydratarme Kost und eine Vermehrung der β -Lipoproteine eine Ernährung, die arm an Cholesterin und gesättigten Fetten, sowie reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist.

Auch für eine medikamentöse Therapie ist eine vorherige Typendiagnose zu fordern, da z. B. Cholestyramin und D-Thyroxin bei den Typen III-V unwirksam sind, Clofibrat dagegen beim Typ IIa nicht wirkt.

Während die Bestimmung von Triglyzeriden und Cholesterin zu den klinisch-chemischen Routineuntersuchungen zu zählen sind, die auch im Labor des niedergelassenen Arztes ohne weiteres durchführbar sind, bereitet die Lipoproteinelektrophorese z.T. immer noch erhebliche Schwierigkeiten.

Fragestellung:

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die verschiedenen Methoden der Lipoproteinelektrophorese zu beschreiben und ihre diagnostische Aussagekraft insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen Trägermedien (Papier, Agar, Agarose, Celluloseacetatfolien und Polyacrylamid) zu vergleichen. Mit in diesen Methodenvergleich einbezogen werden auch der zeitliche und finanzielle Aufwand sowie der technische Schwierigkeitsgrad und die apparativen Voraussetzungen.

Am Beispiel der Agaroseelektrophorese sollen zusätzlich die verschiedenen beschriebenen Modifikationen durch eigene experimentelle Untersuchungen miteinander verglichen werden.

2. Lipoproteinelektrophorese auf Papier:

Das erste Trägermaterial, das man für die Elektrophorese der Lipoproteine verwandte, war Filterpapier.

Verschiedene Arbeitskreise (Durrum⁽²⁰⁾, Swahn⁽⁹¹⁾, Nikkilä⁽⁶⁴⁾, Fasoli^(23,24,25), Wunderly und Petzold⁽⁹⁸⁾) beschäftigten sich 1951/2 unabhängig voneinander, zuerst mit dieser Methode.

Der wesentliche Nachteil bestand in einer völlig unzureichenden Abtrennung der prae- β Lipoproteinbande.

1963 gelang der Arbeitsgruppe Lees und Hatch⁽⁵⁴⁾ durch Verwendung von albuminhaltigem Barbituratpuffer eine schärfere Trennung der 3 Hauptlipoproteinbanden und teilweise eine Darstellung der prae- β Bande.

Erst diese Methode ermöglichte die Typisierung der Hyperlipoproteinämien.⁽³¹⁾

Obwohl in zunehmendem Maße andere Trägermedien zur Lipoproteinauftrennung verwendet werden, bringt dieses- allerdings aufwendiges Verfahren- in der Hand des Erfahrenen durchaus verwertbare Resultate.

2.1. Bedingungen:

Laufzeiten, Spannungen, Stromstärken und Elektrophoresegeräte siehe Tabelle 3

Pufferlösungen siehe Tabelle 5

Färbelösungen siehe Tabelle 6

Vergleichbare Filterpapiere siehe Tabelle 4

2.1.1. Vertikale oder horizontale Elektrophorese:

Fredrickson⁽³⁰⁾ erzielte bessere Ergebnisse mit der vertikalen (Durrum hanging strip cell) Elektrophoresezelle als mit einer horizontalen Zelle.

2.1.2. Vorreinigung des Filterpapiers:

Von M. Moinuddin⁽⁶¹⁾ wurde eine Vorreinigung des Filterpapiers angegeben, um schärfere Trennungen zu erreichen. Dabei werden Whatman 3 MM Papierstreifen 1/2-1 Stunde in Methanol gekocht und über Nacht getrocknet.

Dann wird mit einem modifizierten Soxhlet extractor (Scientific Glass Apparatus Co) 10-20 Mal in einem Chloroform-Methanolgemisch 20 Stunden lang extrahiert. Der gleiche Prozess wird mit Diäthyläther wiederholt. Fredrickson⁽³⁰⁾ empfiehlt, vor der Probenauftragung die in Puffer getauchten Filterpapierstreifen 3-4 Stunden in der geschlossenen Elektrophoresekammer zu belassen.

2.1.3. Einfluß des Puffers auf die Wanderungsgeschwindigkeit:

Der TEB-Puffer pH 8,8 wurde mit dem Barbituracetatpuffer pH 8,6 verglichen⁽⁹⁰⁾. Um die gleiche Wanderungstrecke zu erhalten, benötigt man mit dem TEB-Puffer eine höhere Spannung und eine längere Elektrophoresezeit verglichen mit dem Barbitalpuffer.

2.1.3.1. Einfluß des Puffers auf die Trennschärfe:

F.R.Sonnino⁽⁹⁰⁾ erzielte mit dem TEB-Puffer eine bessere Trennung der β - von der prae- β Bande, verglichen mit dem Barbitalpuffer. Der Autor meint, daß durch den TEB - Puffer die Absorption der Lipoproteine an das Filterpapier geringer wird.

2.1.3.2. Einfluß von Albumin im Puffer auf die Trennschärfe:

Eine bessere Trennung der Lipoproteinbanden läßt sich durch albuminhaltigen Puffer erreichen.

Kallee et al führten vor der Lipoproteinelektrophorese eine Vorelektrophorese mit albuminetränktem Filterpapierstreifen durch⁽⁵⁴⁾

Lees und Hatch⁽⁵⁴⁾ konnten in einem Barbitalpuffer, der Albumin in 1 %iger Konzentration enthielt, eine

bessere Trennung der Lipoproteinbanden erzielen.

Nach Ray, Davisson u. Crepi⁽⁵⁴⁾ verhindert Albumin eine Oxydation der Lipoproteine.

Die im Albumin vorhandenen Freien Fettsäuren, die die Auftrennung der Lipoproteine stören, wurden durch Austauschchromatographie auf Amberlite G-400 entfernt.

Dabei wurde eine 25 %ige Albuminlösung über eine Säule Amberlite (G-400) chromatographiert.

Der albuminhaltige Puffer sollte jeweils frisch angesetzt und sofort verbraucht werden. Notfalls kann der Puffer einige Tage bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.1.4. Färbung der Lipoproteine:

Für die Lipoproteinelektrophorese auf Filterpapier werden zwei Farbstoffe verwendet: Öl-Rot-O und Sudanschwarz-B, wobei Öl-Rot-O bevorzugt für die Färbung nach der Elektrophorese, Sudanschwarz-B für die Vorfärbung benutzt wird.

Siehe Tabelle 6.

2.1.4.1. Sudanschwarz-B als Mittel für die Vorfärbung:

Sudanschwarz-B lagert sich in den Lipidteil der Lipoproteine ein und wandert in der Elektrophorese passiv mit.

Dadurch, daß es keine eigene Ladung besitzt, wird die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Lipoproteine in ihrer Relation zueinander nicht gestört.

Überschüssiger Farbstoff bleibt an der Auftragsstelle liegen.⁽⁵⁷⁾

2.1.5. Entfärben des Hintergrunds:

Die Papierstreifen, die mit Öl-Rot-O angefärbt wurden, werden für 2 Minuten in ein Gefäß mit

H₂O dest. gelegt.

2.1.6. Trocknen der Papierstreifen:

Die Streifen werden für 15 Minuten bei 120°C in einen Wärmeschrank gelegt. (61,45)

Bei niedrigeren Temperaturen benötigt man längere Zeiten. (75) (20 Minuten bei 95°C)

2.1.7. Serummenge:

Auf einen Filterpapierstreifen (von ungefähr 2,9.30 cm Größe) werden mit der Mikropipette 20-40 ml Serum aufgetragen.

2.1.8. Auswertung:

Die Lipoproteine können nur qualitativ über die Typisierung der verschiedenen Muster ausgewertet werden. Auf die automatische Auswertung der Lipoproteine mit dem Extinktionsschreiber, wie sie bei der Eiweißelektrophorese gehandhabt wird, sollte verzichtet werden.

Dafür gibt es mehrere Gründe. So ist die Gesamt-lipidbestimmung für die Rel % Angabe wesentlich ungenauer als die Biuretmethode bei der Eiweißelektrophorese.

Außerdem gibt es für die Lipoproteine keine passenden Standardseren, da die Lipoproteine bekanntlich sehr empfindlich sind und sich mit der Zeit in ihrer Beschaffenheit verändern. Noch ungenauer ist die Elutionsmethode. (99)

2.2. Empfehlungen für die Lipoproteinelektrophorese Auf Papier:

1. Die vertikale Elektrophorese ist der horizontalen vorzuziehen. Am häufigsten wird das Gerät nach

Durrum angewandt. (30,61,54)

2. Die Elektrophorese sollte bei 21°C durchgeführt werden. Temperaturen von über 24°C sollten vermieden werden. (57)

3. Die Filterpapiere Schleicher und Schüll 2043 A (54,46,57) Whatman Nr.1 (90,46,75,30) und Whatman 3 MM (45,61,19,80) werden am häufigsten gebraucht.

Die besten Ergebnisse erhält man mit vorgereinigtem Filterpapier.

4. Der TEB-Puffer (61,57) ist dem Barbitalpuffer überlegen. Bei diesem Puffer ist ein Albuminzusatz nicht notwendig.

2.3. Nachteile der Lipoproteinelektrophorese auf Papier:

1. Die Undurchsichtigkeit des Trägermaterials.
2. Die Schleppenbildung während der Elektrophorese, wobei vorzugsweise $s_{f20-10}^{20-10^5}$ Lipoproteine zurückgehalten werden.
3. Die geringe Empfindlichkeit der Methode.
4. Der Hintergrund wird mit angefärbt (43)
5. Die lange Elektrophoresendauer.

2.4. Vorteile der Lipoproteinelektrophorese auf Papier:

1. Technische Einfachheit
2. Wirtschaftlichkeit

3. Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat:

Charman und Landowne⁽¹³⁾ und Chin und Blankenhorn⁽¹⁴⁾ versuchten als Erste die Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat.

Verglichen mit der Papierelektrophorese läßt sich diese Methode mit einem geringeren Zeitaufwand durchführen.

Allerdings sind mehr Arbeitsgänge erforderlich.

3.1. Arbeitsgänge:

1. Die Elektrophoresekammer wird gleichmäßig mit Puffer gefüllt.
2. Die zugeschnittenen Celluloseacetatstreifen (ungefähr 25 x 120 mm) werden in frisch angesetzten Puffer getaucht.
3. Vorsichtig werden die Streifen mit Filterpapier abgetupft und in die Kammer eingesetzt.
4. Für 5 Minuten wird eine Spannung von 150 V angelegt.
5. Danach werden mit einer Mikropipette oder einem Auftragsstempel 10 µl Serum auf einer markierten Linie aufgetragen. Die Spannung wird angelegt.
7. Nach der Elektrophorese werden die Streifen entweder mit Öl-Rot-O oder mit Schiffs Reagenz (nach Ozonierung) angefärbt.
8. Die Streifen, die mit Öl-Rot-O angefärbt wurden, werden anschließend in ein Entfärbebad gelegt und diejenigen, die mit Schiffs Reagenz behandelt wurden, werden in ein Reduzierbad gegeben.
9. Danach kommen die Streifen in ein Transparenzbad.
10. Schließlich werden die Streifen getrocknet und konserviert.

3.2. Bedingungen:

Laufzeiten, Spannungen, Stromstärken und Elektrophoresegeräte siehe Tabelle 3

Vergleichbare CAF-Folien siehe Tabelle 7

Vergleichbare Pufferlösungen siehe Tabelle 5

Farblösungen siehe Tabelle 6

3.2.1. Einfluß der Pufferkonzentration auf die Trennschärfe:

Ch.Peyer und H.P.Rieder⁽⁷⁰⁾, die einen Barbituratpuffer der Ionenstärke 0,1 und vom pH 8,4 benutzten, beobachteten bei Verwendung eines Puffers niedriger Konzentration eine Verminderung der Trennschärfe.

3.2.2. Färbung:

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Anfärbemethoden für die getrockneten Elektrophoresestreifen verwendet.

Die Färbung mit Öl-Rot-O und mit Schiffs Reagenz.

3.2.2.1. Gegenüberstellung der zwei Färbemethoden:

Öl-Rot-O

Schiffs Reagenz

1. Färbung

1. Vorbehandlung

Die Streifen werden

Nach der Elektrophorese werden

über Nacht in der
37°-40° warmen
Farblösung angefärbt

2. Waschung:

Die Streifen werden
15 Minuten lang in
Wasser gelegt.

Vorteile:

Der Arbeitsaufwand ist
gering

Nachteile:

Die Färbung dauert
sehr lange
(8-16 Stunden)

Bei der Waschung kann
Farbstoff aus den
Lipoproteinbanden
herausgelöst werden
(93)

die Streifen zunächst 15 Minu-
ten lang mit Kunkels Lösung
(1 g Phenol und 12 g NaCl ad
100 ml aqua dest.) getränkt.
Dadurch werden die beim Fär-
beprozess störenden Protein-
anteile durch Denaturierung
eliminiert.

2. Trocknung (an der Luft)

3. Ozonierung:

Die getrockneten Streifen werden
in eine Glaskammer mit luftdicht
schließendem Deckel eingehängt.
Auf den Boden des Glasbehälters
wird ein kleines Becherglas mit
wasserfreiem Bariumoxid gestellt,
auf das mit einer Pipette kon-
zentrierte Schwefelsäure aufge-
tropft wird. Danach wird die un-
ter dem Abzug stehende Glaskam-
mer geschlossen. Das Prinzip
dieses Verfahrens beruht auf der
Abspaltung von Aldehyden von den
Esterfettsäuren, die sich mit
Schiffs Reagenz anfärben lassen.
(indirekte Färbung). Die Strei-
fen bleiben 15 Minuten in der
Ozonisierungskammer.
Neuerdings wird die Ozonisierung
mit einer Ozonisierungslampe
durchgeführt. (93)

4. Färbung:

Nachdem die Streifen eine Minute
lang mit 0,01 N HCl gewaschen
wurden, werden sie mindestens
15 Min. lang mit Schiffs Reagenz
angefärbt.

5. Reduzierbad:

Die Streifen werden jeweils für 5 Minuten in 3 Reduzierbädern ($K_2S_2O_5$ in 0,1 N HCl) gespült, bis der Hintergrund farblos ist. Anschließend werden die Streifen 15 Min. in 0,01 N HCl gewaschen.

Vorteile:

Kürzere Färbezeit,
bessere Anfärbung

Nachteile:

Größerer Arbeitsaufwand

Das bei der Ozonierung entstehende SO_2 reizt die Schleimhäute

3.2.2.2. Andere Farbstoffe:

J.D.Beats⁽³⁾ färbt seine Celluloseacetatstreifen mit einer Mischung von Sudan-Schwarz-B und Ciba 7B an.

C. Vergani⁽⁹²⁾ färbt seine Streifen mit Fast Red an.

3.2.3. Transparenzverfahren:

Um eine Transparenz der Streifen zu erhalten, wurden folgende Verfahren erprobt:

- a. Eintauchen der Streifen in Glycerin⁽¹⁴⁾
- b. Eintauchen der Streifen in 95 %iges Methanol, das 10 % Eisessig enthält.⁽²²⁾

- c. Zunächst werden die Streifen für 4 Min. in abs. Alkohol gelegt und danach kommen sie für 4 Min. in ein Äthanol-Eisessig-Gemisch (10:90)⁽⁷²⁾

3.2.4. Serummengen:

Makromethode:

Mikromethode:

Farber⁽²²⁾ trägt 15 μ l auf

Fletcher⁽²⁷⁾ benötigt 0,5 μ l

Vergani⁽⁹²⁾ trägt 6 μ l auf

Grabner⁽³⁵⁾ benötigt 0,75 μ l

Klemens⁽⁴⁹⁾ trägt 10 μ l auf

Charman⁽¹³⁾ trägt 5 μ l auf

Chin⁽¹⁴⁾ trägt 10 μ l auf

Postma⁽⁷²⁾ trägt 6 μ l auf

3.2.5. Methoden für die Serumapplikation:

Für die Auftragung der Serumprobe verwendet man:

a. mit Serum durchtränkte Papierstreifen

b. Auftragsstempel der Fa. Beckman^(35,92,27,63)

c. LKB-Applikator⁽⁴⁹⁾

d. Gelman sample Applikator⁽⁴⁹⁾

e. Spezialstempel von Postma und Stroes⁽⁷²⁾

3.2.6. Densitometrische Auswertung:

s. Papierelektrophorese

3.3. Vorteile der Celluloseacetatelektrophorese:

- a. Verglichen mit der Papierelektrophorese nimmt die Celluloseacetatelektrophorese sehr wenig Zeit in Anspruch.
- b. Die Auftrennung der Lipoproteine ist besser, weil dieses Trägermedium eine homogenere Beschaffenheit besitzt.
- c. Da in der Praxis die Eiweißelektrophoresen vielfach auf Celluloseacetat durchgeführt werden, kann die gleiche apparative Einrichtung für die Lipoproteinelektrophorese verwendet werden.
- d. Ein Albuminzusatz in den Puffer ist nicht notwendig.

3.4. Nachteile der Celluloseacetatelektrophorese:

- a. Das Material ist teuer
- b. Der Arbeitsaufwand ist größer, besonders, wenn man die Färbung mit Schiffs Reagenz vornimmt.

4. Agarose -Gel - Elektrophorese:

Wieme⁽⁹⁴⁾ trennte die Plasmaproteine in Reinagar. Eine bessere Trennung erzielte man mit Agarose, einem Bestandteil des Agars.

4.1. Arbeitsgänge:

1. Die Elektrophoresekammer wird gleichmäßig mit Puffer gefüllt.
2. Die Gele werden gegossen.
3. Mit einem Gelschneider werden die Rillen für die Proben ausgestanzt.
4. Die Proben werden vorbereitet.
5. Die Proben werden in die ausgestanzten Rillen gefüllt.
6. Die Spannung wird angelegt.
7. Nach der Elektrophorese werden die Gele fixiert.
8. Die Gele werden getrocknet.
9. Schließlich erfolgt die Färbung.

4.2. Bedingungen:

Laufzeiten, Spannungen, Stromstärken und Elektrophoresegeräte siehe Tabelle 3

Agarose siehe Tabelle 8

Vergleichbare Pufferlösungen siehe Tabelle 5

Farblösungen siehe Tabelle 6

Herstellung der Gele siehe Tabelle 9

Probenbereitung siehe Tabelle 10

Fixierung siehe Tabelle 11

Trockenzeiten, Temperaturen siehe Tabelle 12

4.2.1. Konstante Stromstärke oder konstante Spannung:

Während der Elektrophorese kann man beobachten, daß bei konstant angelegter Spannung die Stromstärke zunehmend kleiner wird, d.h., daß die Teilchen im elektrischen Feld immer langsamer werden.

Wählt man hingegen eine konstante Stromstärke, so bleibt die Wanderungsgeschwindigkeit während der Elektrophorese konstant.

Eine konstante Stromstärke sollte man aber nur dann einstellen, wenn durch alle Gele ein gleichmäßig starker Strom fließen kann. Das ist dann der Fall, wenn alle Gele unbeschädigt und gleichmäßig strukturiert sind, und der Kontakt zum Puffer an keiner Stelle unterbrochen ist.

4.2.2. Probenbereitung:

Kindler⁽⁴⁸⁾ bringt das Plasma unverdünnt in das Gel ein. Noble^(66,65), Dyerberg und Hjerne⁽²¹⁾, Kahlke und Schlierf⁽⁷⁶⁾, Zöllner⁽¹⁰⁰⁾ und Hulley⁽⁴²⁾ versetzten es mit einer Agaroselösung. (siehe Tabelle 10)

4.2.3. Rillen für die Proben:

Die Rillen werden mit einem Gelschneider aus dem Gel gestanzt.

4.2.3.1. Größe der Rillen:

2 x 20 mm^(66,65)

1,3 x 13 mm⁽²¹⁾

2 x 10 mm⁽¹⁰⁰⁾

C. Sirtori⁽⁸⁹⁾ legt vor dem endgültigen Erstarren des Gels ein 1 cm langes Stück einer Injektionsnadel in das Gel. Sobald das Gel fest geworden ist, wird das Nadelstückchen mit einem Magneten entfernt.

4.2.4. Vorfärbemethode:

Glashan⁽³³⁾ mischt 0,6 ml Serum mit 0,4 ml 0,5 % iger Sudanschwarz-B-Lösung in Äthylenglycol. Diese Mischung bleibt 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wird sie für 10 Minuten in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt. 0,6 ml der warmen Serum-Färbelösung werden mit 0,3 ml einer 2,25 % igen Agarose-Pufferlösung versetzt. Die Agarose-Pufferlösung wird folgendermaßen hergestellt:

0,75 g Agarose wird mit 50 ml dest. Wasser gemischt und aufgekocht. Zu der Agaroselösung werden noch 50 ml dest. Wasser und 50 ml Barbituratpuffer gegeben. (pH 8,6; 0,1 M)

4.3. Auswertung:

s. Papierelektrophorese

4.4. Einfluß der Konzentration der Agarose auf die Trennschärfe:

Rapp und Kahlke⁽⁷⁶⁾ benützten 0,8 % ige Agarose. Noble⁽⁶⁶⁾ fand, daß sich die Auftrennung der β - und der prae- β -Lipoproteine mit abnehmender Agarosekonzentration verbesserte. Er benützte deshalb eine Schicht aus 0,5 %iger

Agarose, die durch 0,6 %igen Agar gehärtet wird.
Leider ist diese Schicht sehr leicht verletzlich.

4.5. Vorteile der Agaroseelektrophorese:

1. Laboratorien, die eine Immunelektrophorese auf Agar-gel oder Agarosegel durchführen, können die Methode der Lipoproteinelektrophorese auf die dafür schon vorhandenen Geräte adaptieren.
2. Wenn man alle Möglichkeiten, die Arbeitszeit zu verkürzen, ausnützt, hat man 6-7 Stunden nach der Blutentnahme ein fertiges Lipoproteinmuster zur Verfügung.
3. Eine Kombination mit einem immunologischen Nachweis bestimmter Proteine im gleichen Trägermedium ist möglich.

5. Disk - Elektrophorese:

Die eleganteste Methode für die Lipoprotein-elektrophorese ist die Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel.

Aufgrund seiner Thermostabilität, Transparenz, Härte und seiner chemischen Inertheit ist es ein ideales Trägermedium.

Das besondere Trennvermögen der Methode beruht auf der Kombination eines durch die Gitterstruktur des Polyacrylamid bedingten Molekularsiebeffektes und eines Konzentriereffektes, der durch die Einführung eines diskontinuierlichen Puffersystems erreicht wird.

5.1. Bedingungen:

5.1.1. Gele:

Für die Lipoproteinelektrophorese in Polyacrylamid werden 3 verschiedene Gelschichten benötigt:

1. Ein kleinporiges Gel (Separating Gel)
2. Ein großporiges Gel (Stacking Gel)
3. Ein Probengel.

5.1.1.1. Das kleinporige Gel (Separating Gel)

Gelkonzentrationen:

Narayan⁽⁶²⁾, Ornstein u. Davis⁽⁶⁸⁾: 7,5 %ige Polyacrylamidlösung

Frings⁽³²⁾, Pratt und Dangerfield⁽⁷³⁾ :

6,5 %ige Polyacrylamidlösung

Raymond⁽⁷⁷⁾:

8 %ige Polyacrylamidlösung

Dieses Gel wird nur zur Aufrechterhaltung eines diskontinuierlichen pH- und Konzentrationsgradienten gebraucht.

Herstellung der kleinporenigen Gellösung (Separating Gel):

(68)

Stammlösung A: 48 cm³ 1 N HCl
36,6 g Tris
0,46 cm³ N,N,N',N'- tetramethyldiamin
werden in dest. Wasser gelöst und auf 100 ml
aufgefüllt. (pH: 8,9)

Stammlösung B: 30 g Acrylamid
0,8 g N,N'-methylenbisacrylamid
15 mg K₃Fe (CN)₆
werden mit dest. Wasser auf 100 ml
aufgefüllt.

Stammlösung C: 0,14 g (NH₄)₂S₂O₃ werden mit dest. Wasser
auf 100 ml aufgefüllt.

Herstellung des Gels:

Lsg A:Lsg B: Lsg C: dest. Wasser = 1:2:4:1

Polymerisation: 40 Min. bei Raumtemperatur

(73)

Acrylamid	6,5 %
Tris	0,26 M
HCl	0,07 M
Sucrose	15 % (w/v)

pH 8,6, Ionenstärke 0,07

Katalysator: 10 % (w/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	0,25 ml
10 % (w/v) TEMED	0,25 ml

Gelhöhe: 7cm

(32)

Lösung A: 36,6 g Tris
0,23 ml TEMED
werden in 100 ml dest. Wasser gelöst;
48 ml 1 N HCl werden hinzugegeben.
Die Lösung wird mit dest. Wasser auf 200 ml
verdünnt.
pH: 8,9
3 Monate bei 4°C haltbar.

Lösung C: 15 g Acrylamid
0,4 g Bisacrylamid
in dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Lösung G: 0,14 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ werden in 100 ml aqua dest.
gelöst.

Lsg A: Lsg C: Lösung G = 1:1:2

5.1.1.2. Das großporige Gel (Stacking Gel):

Gelkonzentrationen:

Wollenweber und Kahlke ⁽⁹⁷⁾ :	3,25 %ige Gelkonzentration
Dangerfield und Pratt ⁽⁷³⁾ :	2 %ige Gelkonzentration
S. Raymond ⁽⁷⁷⁾ :	3 %ige Gelkonzentration
Ornstein und Davis ⁽⁶⁸⁾ :	2,5 %ige Gelkonzentration

Herstellung der großporigen Gellösung:

(68)

Stammlösung D: 48 cm³ 1 N HCl und
5,98 g Tris werden in dest. Wasser gelöst
und auf 100 ml verdünnt (pH:6,7)

Stammlösung E: 4 mg Riboflavin werden in 100 ml
dest. Wasser gelöst.

Stammlösung F: 10 g Acrylamid
2,5 g N,N'-methylbisacrylamid
werden in dest. Wasser gelöst
und auf 100 ml verdünnt.

Lsg D: Lsg E: Lsg F: dest. Wasser = 1:2:2:4

Polymerisationszeit mit der Fluoreszenzlampe: 15 Min.

(73)

Acrylamid	2 % (w/v)
Tris	0,0578 M
H ₃ PO ₄	0,0333 M

pH bei 20°C: 7,25; Ionenstärke 0,05

Katalysator:	10 % (w/v)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	0,25 ml
	10 % (v/v)	TEMED	0,25 ml

(32)

Lösung B: 5,98 g Tris
0,46 ml TEMED
48 ml 1 N HCl werden in dest. Wasser
gelöst und auf 100 ml verdünnt. (pH:6,7)

Lösung D: 20 g Acrylamid
5 g Bisacrylamid
werden in 200 ml dest. Wasser gelöst.

Lösung E: 8 mg Riboflavin werden in 100 ml
dest. Wasser gelöst.

Lösung F: 200 g Sucrose werden mit dest. Wasser
gelöst und auf 500 ml verdünnt.

Lsg B: Lsg D: Lsg E: Lsg F = 1:2:1:4

Die Lösung kann 1 Monat bei 4°C in einer braunen Flasche aufbewahrt werden.

Pratt und Dangerfield⁽⁷³⁾ haben eine Methode entwickelt, bei der ein 2 % iges großporiges Gel von einem pH von 7,23 und einer Ionenstärke von 0,051 fließend in ein solches mit einer Acrylamidkonzentration von 6,5 %, einem pH von 8,56 und einer Ionenstärke von 0,068 übergeht.

5.1.2. Polymerisationsmethoden:

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, eine Acrylamid-lösung zu polymerisieren:

a. Die chemisch eingeleitete Polymerisation:

Sie wird mit Persulfat eingeleitet und liefert einheitliche Polymere. Das Persulfat wird vor der Gelherstellung zugesetzt.

b. Die Photopolymerisation:

Sie wird durch Riboflavin vermittelt und erfordert eine Kontrolle der Lichtintensitäten. Sie liefert weniger einheitliche Polymere, hat aber den Vorteil, daß die Gellösungen schon Wochen vor Gebrauch angefertigt werden können.

5.1.3. Pufferlösungen:

Puffer	Herstellung	Lit.
Tris-Glycin (pH:8,3)	6 g Tris, 28,8 g Glycin pro 1 l dest. Wasser	(68,32,97)

Puffer	Herstellung	Lit.
kathodisches Pufferbad:		(73)
0,15 molare Glycinlösung in 0,01 N NaOH Lsg		
anodisches Pufferbad:		
0,15 molare Glycinlösung in 0,05 N HCl Lsg		

5.1.4. Elektrophoresezeit, Spannung, Stromstärke

s. Tabelle 13

5.1.5. Bereitung der Probe bzw. des Probengels:

s. Tabelle 15

5.1.6. Elektrophoresegeräte:

s. Tabelle 14

5.2. Arbeitsgänge: (8)

- a. Die Röhrchen werden in ein Gestell eingesetzt, in dem sie eine vertikale Lage einnehmen.
- b. Die Separating-Gel-Lösung wird mit einer automatischen Spritze eingefüllt.
- c. Vorsichtig wird die Gellösung mit einer ca. 4 mm hohen Lage von dest. Wasser überschichtet.
- d. Nach der Polymerisation wird die Wasserlage vorsichtig entfernt.
- e. Das Stacking-Gel wird eingefüllt.
- f. Wie Schritt c und d.

- g. Das Probengel wird eingefüllt.
- h. Das Probengel wird mit Puffer überschichtet.
- i. Nach der Polymerisation des Probengels werden die Röhrrchen in das Elektrophoresegerät eingesetzt.
- k. Die Spannung wird angelegt.
- l. Nach der Elektrophorese können die Röhrrchen ausgewertet werden.

5.2.1. Reinigen der Röhrrchen:

Die Röhrrchen werden in Seifenlösung gewaschen, danach in Kaliumdichromatschwefelsäurelösung eingeweicht und dann gründlich mit dest. Wasser durchgespült.

Danach werden sie in eine Speziallösung⁽⁸⁾ getaucht und in vertikaler Lage getrocknet.

5.2.2. Entfernen der Gele aus den Röhrrchen:

Man benützt dazu eine lange Injektionsnadel, mit der man an der inneren Glaswand entlangfährt und ständig dest. Wasser zwischen Gel und Glas spritzt.

5.3. Härten eines 3 %igen Gels:

S. Raymond ⁽⁷⁷⁾ fand, daß man mit 3 %igen Gelen schlecht umgehen kann. Das Gel läßt sich schlecht schneiden und nur mit erheblichen Schwierigkeiten aus den Röhrrchen herauslösen. So fand er folgenden Weg, das 3 %ige Gel zu härten:

Die 8 %ige Gelschicht, die kein Lipoprotein-

muster enthält, wurde entfernt. Das zurückgebliebene Gel wurde mit 120 ml Puffer, der 10 % Cyanogum, 1 % TEMED (mit Persulfat) enthielt, überschichtet.

Auf diese Art und Weise konnte er das 3 %ige Gel in ein 8 % iges überführen.

5.4. Ammoniumpersulfat und Sudanschwarz:

Ein Überschuß an Ammoniumpersulfat oxydiert den Farbstoff Sudanschwarz B⁽⁷³⁾. Dies läßt sich dadurch vermeiden, indem man die Polymerisation der Gele, die durch Ammoniumpersulfat eingeleitet wird, ein paar Stunden vor der Elektrophorese stattfinden läßt.

So wird der Überschuß an Ammoniumpersulfat zerstört und der Farbstoff kann nicht mehr angegriffen werden.

5.5. Lagerung von Separating-Gele:

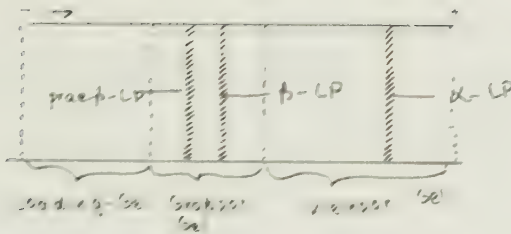
Werden Separating-Gele mit einer Lagerungsflüssigkeit überschichtet, so können sie bis zu 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.⁽⁸⁾

5.6. Toxizität des Acrylamids:

Acrylamid ist ein ausgesprochenes Nervengift. In geringen Mengen an die Haut gebracht, ruft es Hautirritationen hervor. Im polymerisierten Zustand ist es jedoch harmlos.

5.7. Auftrennung der Lipoproteine:

Die Lipoproteine werden in diesem Gelsystem folgendermaßen aufzutrennt:



Daselbst zeigt auf, daß die prae- β -Lipoproteine, die in Papier, Celluloseacetat und Agarose vor die β -Bande zu liegen kommen, ihr in dieser Methode, nachhinken.

Durch den speziellen Molekularsieoeffekt kann bei der Disc-Elektrophorese ein Molekül mit einer relativ großen Ladung, aber mit einem großen Moleküldurchmesser hinter einem kleineren Molekül mit einer geringeren Ladung zu liegen kommen.

5.8. Auswertung:

Nach der Elektrophorese müssen die Röhren sofort ausgewertet werden. Es empfiehlt sich, die Röhren zu fotografieren.

5.9. Empfindlichkeit der Methode:

Nach Bergman⁽³²⁾ ist die Disc-Elektrophorese eine empfindlichere Methode zur Trennung der Lipoproteine als die Ultrazentrifugation.

5.10. Zwischenbänder:

Zwischen dem β - und dem prae- β -Bereich wurden 1-3 zusätzliche Bänder gefunden, die in ihrer Zusammensetzung mit β oder α gedeutet werden konnten. (32, 37, 3)

5.11. Vorteile der Disk-Elektrophorese:

1. Das Auflösungsvermögen ist besonders groß.
2. Die einzelnen Banden werden scharf voneinander abgetrennt.
3. Da die Separating-Gele vorgegossen, die Seren vorgefärbt werden können, ist der Zeitaufwand sehr gering im Verhältnis zu anderen Methoden.

5.12. Nachteile der Disk-Elektrophorese:

1. Die Herstellung der Gele erfordert einen erheblichen Arbeitsaufwand.
2. Technische Schwierigkeiten bei der Polymerisation des PAA-Gels machen die Methode störanfällig.⁽⁹⁷⁾
3. Die Gele lassen sich nicht lagern. Sie müssen nach der Elektrophorese sofort ausgewertet werden.

5.13. Empfehlung:

Die Disk-Elektrophorese sollte vorerst noch bestimmten wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten bleiben.

5.14. Differenzierung von Typ III:

Der Typ III zeigt sich in der Disk-Elektrophorese in 3 verschiedenen Mustern, die leicht von denen anderer Typen zu unterscheiden sind:

- III A: Im Lipoproteinmuster sieht man eine einzige breite Bande von gleichmäßiger Intensität, die im prae- β -Bereich liegt und sich bis in die Mitte, zwischen β -und prae- β -Bereich, ausdehnt.
- III B: Das gleiche Bild wie A, mit einer scharfen Betonung einer Bande im Hintergrund.
- III C: Das gleiche Bild wie A. Man beobachtet aber 2-3 sehr eng aneinanderliegende Banden, von denen eine im prae- β -Bereich, und die anderen gleich darauf anschließend folgen. Der Abstand zwischen den Banden ist enger als bei Typ II oder IV. Außerdem werden die einzelnen Fraktionen nicht durch einen klaren Hintergrund voneinander getrennt.

Eine seltene Form (Typ III D) hat Ähnlichkeiten mit dem Typ IV. Bei Typ IV ist aber der Zwischenraum zwischen β -und prae- β klar, was bei Typ III D nicht der Fall ist. Manchmal kann Typ III, wenn er mit erhöhten Chylomikronen einhergeht, mit Typ V verwechselt werden. Bei Typ V ist aber immer eine schwache, gut abgegrenzte β -Bande vorhanden, was bei Typ III nicht der Fall ist.⁽⁹⁾

5.15. Unterscheidung zwischen Typ II und Typ IV:

Der Abstand zwischen β -und prae- β -Bande ist bei diesem Typ größer als bei Typ II, III oder beim Normaltyp.⁽⁹⁾

6. Lagerung der Seren:

Lipoproteine sind sehr empfindlich. Es ist deshalb von großer praktischer Bedeutung, zu wissen, wie lange man sie bei verschiedenen Temperaturen aufbewahren kann, ohne daß sie sich verändern.

6.1. Veränderung der Lipoproteine bei Zimmertemperatur:

Gottfried⁽³⁴⁾ nahm als Indikator für die Veränderung des Lipoproteinmusters die β -Lipoproteine an. Sie verminderten sich bei Zimmertemperatur:

nach dem 1.Tag um 10 %,

nach 2 Tagen um 20 %,

nach 3 Tagen um 25 %.

Winkelman⁽⁹⁶⁾ hält Proben, die 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, gerade noch für brauchbar.

6.2. Veränderung bei Aufbewahrung bei 2°-4°C:

Die Fa. Bio-Rad⁽⁴⁾ gibt in ihrer Arbeitsanleitung eine Höchstzeit von einer Woche an.

Winkelman⁽⁹⁶⁾ gibt eine Zeitspanne von 28 Tagen an, und Fredrickson behauptet sogar, daß die Proben bis zu mehreren Monaten bei dieser Temperatur zu konservieren sind.

6.3. Veränderung durch einen Frierprozess:

Adlersberg⁽¹⁾ fror Seren über 6 Monate ein und konnte danach keine Veränderung im Lipoproteinmuster feststellen. Auch Dangerfield und Smith⁽¹⁷⁾ fanden keine Veränderungen, nachdem sie Seren mehrere Monate bei -10°C aufbewahrten.

Winkelman⁽⁹⁶⁾ gibt an, daß Seren bis zu 14 Tage eingefroren gelagert werden können. Ein 2. Frierprozess

machte die Proben jedoch unbrauchbar.

Fredrickson ist gegensätzlicher Meinung.⁽³⁰⁾ Er meint, daß Frieren das Lipoproteinmuster irreversibel verändert.

6.4. Art der Veränderung:

Winkelman⁽⁹⁶⁾ beobachtet bei den verschiedenen Typen mit der Celluloseacetatelektrophorese folgende Veränderungen:

- Typ II : Die β -Lipoproteinbande wandert weiter und erscheint in der prae- β -Region, so daß dieser Typ als Typ IV gelesen wird.
- Typ III: Auch hier kommt es zu Veränderungen, so daß dieser Typ als Typ IV gelesen wird.
- Typ IV : Man beobachtet ein Verblässen der prae- β -Bande. Diese Lipoproteine wandern in den alpha-Bereich.
- Typ V : Auch hier wandert die prae- β -Bande in den alpha-Bereich.

6.5. Substanzen, die die Stabilität erhöhen:

EDTA (1 mg/ml Blut) erhöht die Stabilität der Lipoproteine⁽³⁰⁾.

Außerdem ist es besser, Plasma als Serum zu verwenden.

6.6. Diskussion:

Über die Lagerung bei Zimmertemperatur sind sich die Autoren einig: Sie ist sehr ungünstig und kann schon innerhalb von einem Tag das Lipoproteinmuster verändern.⁽⁹⁶⁾

Wesentlich günstiger ist die Lagerung bei 2-4°C. Über die Zeitspanne gibt es bei den einzelnen Autoren aber erhebliche Differenzen. Während Fredrickson⁽³⁰⁾ Plasmaproben bei diesen Temperaturen unter günstigen

Bedingungen mehrere Monate lagert, gibt Winkelman⁽⁹⁶⁾ eine Höchstzeitspanne von 28 Tagen an. Die Bio-Rad-Laboratorien empfehlen 7 Tage.

Über das Frieren herrschen die größten Meinungsverschiedenheiten. Fredrickson⁽³⁰⁾ betont ausdrücklich, daß Frieren das Lipoproteinmuster irreversibel verändert. Dangerfield⁽¹⁷⁾ und Adlersberg⁽¹⁾ konnten nach monatelangem Frieren keine Veränderung des Lipoproteinmusters feststellen.

6.7. Schlußfolgerung:

Um völlig sicher zu gehen, daß sich das Lipoproteinmuster nicht verändert, gelten folgende Empfehlungen:

1. Plasma anstatt Serum verwenden.
2. EDTA hinzufügen.
3. Die Probe sofort nach der Gewinnung bei 2-4°C lagern.
4. Die Elektrophorese sollte sobald als möglich durchgeführt werden.
5. Maximal kann das Plasma, mit EDTA versehen, 7 Tage bei 2-4°C gelagert werden.

7. Eigene Untersuchungen:

7.1. Einleitung:

Lees und Hatch⁽⁵⁴⁾ konnten die Lipoprotein-elektrophorese auf Papier mit einem albuminhaltigem Puffer so entscheidend verbessern, daß Fredrickson⁽³¹⁾ damit die Einteilung der Hyperlipidämien vornehmen konnte.

Nach Crepi⁽⁵⁴⁾ verhindert Albumin die Oxydation der Lipoproteine.

Einen störenden Einfluß üben dabei die freien Fettsäuren aus, die dem Albumin als stabilisierendes Agens im Überschuß zugesetzt werden. Hatch⁽⁵⁴⁾ entfernte sie deshalb säulenchromatographisch.

7.2. Fragestellung:

Es ist bekannt, daß die Kühlung während der Elektrophorese einen günstigen Effekt auf die Trennschärfe ausübt.

Es war wichtig, zu wissen, welchen Einfluß sie speziell auf die Trennung der Lipoproteine ausübt.

In der Papierelektrophorese bewirkt Albumin im Puffer eine wesentliche Verbesserung der Trennschärfe.

Es ist erstaunlich, daß in der Agarose-Gel-Elektrophorese nur wenige Autoren (z.B. Kahlke⁽⁴⁶⁾) ihre Pufferlösung mit Albumin versetzen. Es ist gebräuchlicher, Albumin dem Gel zuzusetzen. (Noble⁽⁶⁶⁾, Dyerberg⁽²¹⁾, Zöllner⁽¹⁰⁰⁾)

Es stellt sich die Frage, welchen Einfluß das Albumin im Puffer und im Gel auf das Lipoproteinmuster hat.

Da das sich im Handel befindliche Rinderalbumin reich an Freien Fettsäuren ist⁽¹¹⁾, wäre es interessant zu wissen, ob und welche Verbesserungen

in der Trennung mit an Freien-Fettsäuren-armen-Albumin im Agarosegel zu erreichen sind.

Noble prüfte 1968⁽¹⁰⁰⁾ die Beziehung zwischen der Agarosekonzentration in der Gelschicht und der Wanderung der Fraktionen und fand, daß die Trennung von prae- β - und β -Lipoproteinen sich mit abnehmender Agarosekonzentration verbesserte. Deshalb wurde untersucht, ob mit einer niedrigeren Gekonzentration bessere Trennungen zu erzielen sind.

7.3. Methodik:

7.3.1. Seren:

Für die Elektrophorese werden nur Seren, die nicht älter als 24 Stunden waren, verwendet. Den Seren wurde kein Stacilitätsagens zugesetzt.

7.3.2. Herstellung der Gele:

Zur Herstellung der Gele wird ein Fläschchen Serva Instant Gel Best.Nr. 26331 in 100 ml aqua bidest. gelöst und unter Schütteln aufgeköcht.

Daraufhin werden die Löcher des Objektträgerhalters (zugehörig zur Shandon Elektrophoresekommer) mit Tesafilm aufgeklebt. Der Objektträgerhalter wird mit acht Objektträgern belegt. Der leicht abgekühlte Agar wird jetzt auf die Objektträger gegossen. Die gleichmäßige Dicke der Gelschicht wird dadurch gewährleistet, daß der Halter für die Objektträger auf einem Nivelliertisch installiert wird. Mit der Pinzette können die Objektträger noch vor dem Erstarren des Gels zurechtgerückt werden.

7.3.3. Auftragen der Probe:

Die Auftragsstelle des zu untersuchenden Serums wird durch eine dünne Rille im Gel definiert. Dazu werden 2-3 mm hohe und 15 mm breite Pappstreifen etwa 1 cm vom Objektträgerrand entfernt, in das Gel gesteckt. Danach werden mit der 5 μ l Marburgpipette 5 μ l Serum hinter dem Pappstreifen so aufgetragen, daß am Anfang des Streifens ein Tropfen gesetzt wird, der mit der Pipettenspitze vorsichtig entlang des Pappstreifens bis bis zum Ende ausgezogen wird.

Danach wird der Pappstreifen vorsichtig herausgezogen, wobei sich die hinterlassene Rille mit Serum füllt.

7.3.4. Vorbereitung zur Elektrophorese:

Der Objektträgerhalter wird, mit den Objektträgern nach unten, in die mit Na- Barbituratpuffer (Serva Nr. 38 185) gefüllte Shandon Elektrophoresekammer gesetzt. Der kontakt zwischen Puffer und Gel wird mittels Filterpapierstreifen hergestellt. Um den Kontakt zu verbessern, kann man die Filterpapierstreifen an der Kontaktstelle zusätzlich mit einem Agarosetropfen versehen.

7.2.5. Elektrophorese:

Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 175 V (etwa 40 mA) vorgenommen. Mit Kühlung dauert die Elektrophorese 125 Minuten, ohne Kühlung 90 Minuten.

7.2.6. Fixierung:

Nach der Elektrophorese nimmt man den Objektträgerhalter aus der Kammer und legt ihn, mit den Objektträgern nach oben, in eine Schale mit 2 %iger Essigsäure. Nach etwa 30 Minuten ist das Gelmuster fixiert.

7.3.7. Trocknen der Gele:

Mit einem Skalpell werden anschließend die einzelnen Objektträger aus ihrer Halterung gelöst. Man deckt die Gele doppelt mit Elektrophoresepapier ab und läßt sie für 4-5 Stunden bei Zimmertemperatur trocknen.

7.3.8. Färbung:

Zur Färbung werden die Objektträger für 4-5 Stunden in eine Lösung von 1 %igem Sudanschwarz in 50 %igen Alkohol gelegt.

7.3.9. Herstellung der Farblösung:

0,8 g Sudanschwarz B werden in 400 ml 60 %igem Alkohol gelöst. Eine Stunde lang wird diese Lösung mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Anschließend wird sie in eine braune Flasche gefüllt und eine Nacht lang stehengelassen. Danach werden 400 ml 40 %iger Alkohol hinzugegeben.

7.3.10. Entfärben des Hintergrunds:

Die Objektträger werden kurz in 50 %igen Alkohol getaucht.

7.3.11. Trocknen der Objektträger:

Zum Trocknen werden die Objektträger auf Filterpapier gelegt und mit Filterpapier zugedeckt.

7.3.12. Waschung von Rinderalbumin nach Campbell⁽¹¹⁾

Es wurden 10 g Rinderalbumin reinst (Behringwerke Marburg) mit einem Gemisch aus 75 ml Äthanol und 25 ml Diäthyläther in einem 800 ml Becherglas 15 Min. bei 0°C durchmischt. Die Suspension wurde durchgefilitert und der Überstand mit 1 1/2 Flaschen wasserfreiem Diäthyläther ausgewaschen. Daraufhin wurde die Substanz auf einem Filterpapier ausgebreitet und im Vakuum getrocknet.

7.3.13. Säulenchromatographische Befreiung der Freien Fettsäuren vom Rinderalbumin mit Amberlite G 400 II:

Nach der Methode von Lees und Hatch⁽⁵⁴⁾ wurden 4 ml einer 25 %igen Rinderalbuminlösung über eine Amberlite G 400 II Säule chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem Barbitalpuffer pH 8,6; 0,1 M; 0,001 EDTA.

Die Albuminlösung wurde danach, um die Pufferionen weitgehend zu beseitigen, mit aqua bidest. in einem Källe Dialysierschlauch über Nacht im Kühlschrank dialysiert. Anschließend wurde die Lösung lyophilisiert. Dieses Albumin wurde für die Elektrophorese verwandt.

7.3.14. Herstellung des albuminhaltigen Gels:

Die Gele wurden nach Zöllner⁽¹⁰⁰⁾ hergestellt. Instant-Gel A 08-82, Serva Labor Heidelberg wird in 100 ml aqua bidest. kurz aufgeköcht. Zu 50 ml des etwa 50°C warmen, flüssigen Gels, wird im Standardverfahren, 1 ml einer mit 1 M Trispufferlösung auf pH 8,2 eingestellten 13,3 %igen Rinderalbuminlösung zugesetzt und gut durchmischt.

7.3.15. Herstellung von verdünntem Gel:

Löst man eine Packung Serva Instant Gel in 100 ml aqua bidest.auf, so erhält man ein 8 %iges Gel.
Ein verdünntes Gel von 0,58 % erhält man, wenn man 1,0227 g einer Packung entnimmt, und diese, in 100 ml aqua bidest., auflöst.

7.3.16. Herstellung der Kühlung:

Die Kühlung wurde mit Hilfe einer mit Eis gefüllten Plastikschale bewerkstelligt, die auf den Objektträgerhalter gestellt wurde.

7.4. Bestimmung der Freien Fettsäuren in einer 1 % igen Rinderalbuminlösung:

Die Freien Fettsäuren wurden titrimetrisch bestimmt:
Es wurden je 3 Proben 2x bestimmt:

Albumin unbehandelt:	0,56 mval/l
	0,59 mval/l
	0,57 mval/l
	0,57 mval/l
	0,57 mval/l
	0,57 mval/l
Mittelwert:	0,57 mval/l
Standardabweichung:	0,0001
Albumin nach Campbell gewaschen:	0,40 mval/l
	0,40 mval/l
	0,40 mval/l
	0,40 mval/l
	0,40 mval/l
	0,40 mval/l
Mittelwert:	0,40 mval/l
Standardabweichung:	0

Albumin, das säulenchromatographisch gereinigt wurde:

2,77 mval/l

0,075 mval/l

0,075 mval/l

0,075 mval/l

0,075 mval/l

0,075 mval/l

Mittelwert:

0,075 mval/l

Da der 1. Wert so unwahrscheinlich hoch ausgefallen ist, wird er nicht berücksichtigt.

Standardabweichung:

0

Ergebnisse: siehe Tabelle 16

7.5. Diskussion:

Nach den Erfahrungen mit der Lipoproteinelektrophorese auf Papier⁽⁵⁴⁾ war zu erwarten, daß der Zusatz von Albumin in Puffer und Gel auch eine günstigere Form des Lipoproteinmusters bringt.

Nachdem die meisten Autoren keinen Albuminzusatz im Puffer benutzten, war es interessant zu erfahren, welchen Einfluß ein albuminhaltiger Puffer auf die Lipoproteinelektrophorese ausübt.

Anders liegen die Verhältnisse beim Zusatz von Albumin in das Agarosegel.

Dyerberg⁽²¹⁾, Noble⁽⁶⁶⁾ und Zöllner⁽¹⁰⁰⁾ erzielen mit diesem Zusatz homogenere Banden.

Kindler⁽⁴⁸⁾ hält jedoch den Zusatz für unnötig.

Die eigenen Untersuchungen zeigen, daß der Zusatz von Albumin in den Puffer eine Verschlechterung des Lipoproteinmusters bringt und daß ein Zusatz von Albumin in das Gel die Ergebnisse nicht wesentlich verbessert.

So erscheint der große Arbeitsaufwand bei der Herstellung der Gele nicht gerechtfertigt.

Noch aufwendiger ist die Herstellung von Gelen, denen solches Albumin zugesetzt wurde, das säulenchromatographisch von den freien Fettsäuren befreit wurde.

Wie man aus den Ergebnissen sieht, ist die einfache Waschmethode nach Campbell⁽¹¹⁾ völlig unzureichend, so daß man, um befriedigende Resultate zu erzielen, auf die Chromatographische Abtrennung mit Amberlite⁽⁵⁴⁾ zurückgreifen muß. Auch dieser Zusatz bringt keine nennenswerten Verbesserungen. Noble⁽¹⁰⁰⁾ fand 1968, daß sich die Auftrennung der Lipoproteine mit abnehmender Agarosekonzentration besserte. Er arbeitete mit 0,5 %iger Agarose, die er mit 0,6 %igem Agar (mit 0,5 % Albumin) härtete.

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen Nobles überein, nur wurde bei uns mit einer Agarosekonzentration von 0,58 % gearbeitet.

Wie zu erwarten, wirkte sich die Kühlung günstig auf die Trennung der Lipoproteine aus.

7.6. Zusammenfassung:

Nach unseren Untersuchungen läßt sich die Agarosegelelektrophorese lediglich durch die Kühlung und die Gelverdünnung nennenswert verbessern.

8 Diskussion:

Um die verschiedenen Methoden miteinander zu vergleichen, und ihre Vor- und Nachteile gegeneinander abschätzen zu können, wurden sie im vorhergehenden Teil eingehend beschrieben.

An eine Lipoproteinelektrophorese werden im klin.-chem. Labor folgende Forderungen gestellt:

Die Methode soll möglichst rasch und mit geringem Arbeitsaufwand durchgeführt werden können.

Außerdem sollte die Methode eine möglichst kurze Einarbeitungszeit in Anspruch nehmen.

Die Methode soll wirtschaftlich sein.

Einen großen Vorteil bringt eine Archivierung der Lipoproteinemuster.

Eine Grundvoraussetzung ist eine gute Reproduzierbarkeit und eine gute Trennung der β - von der prae- β -Bande, so daß eine Zuordnung zu den einzelnen Hyperlipoproteinämien ermöglicht wird.

8.1. Methoden, die eine verhältnismäßig kurze Einarbeitungszeit erfordern:

Die Einarbeitungszeit wird einerseits von dem techn. Schwierigkeitsgrad, den die Methode bietet, bestimmt, und andererseits ist sie davon abhängig, was sich die med.-techn. Assistentin schon an verschiedenen Techniken angeeignet hat. Besonders kurz ist die Einarbeitungszeit bei der Papierelektrophorese, die die einfachste Technik ist. Außerdem ist die Bio-Rad-Methode, bei der die Agarosegele schon vorgegossen sind, sehr schnell zu lernen.

8.2. Methoden, die einen möglichst geringen Arbeitsaufwand erfordern:

Den geringsten Arbeitsaufwand erfordert wohl die Papierelektrophorese, obwohl sie von allen Methoden die meiste Zeit in Anspruch nimmt.

Der Zeit- und Arbeitsaufwand bei der Celluloseacetat-elektrophorese, der Agarosegelelektrophorese und der Disc-Elektrophorese bewegt sich ungefähr in den gleichen Grenzen. Während es bei der Celluloseacetatelektrophorese mehr Arbeitsgänge zu verrichten gibt, muß man bei der Agarosegel- und der Acrylamid-Disc-Elektrophorese noch die Gele herstellen. Besonders bequem und einfach ist es deshalb, vorgegossene Gele zu benutzen. (Bio-Rad)

8.3. Methoden, die möglichst wenig Neuanschaffungen an Geräten erfordern:

Laboratorien, die schon die Celluloseacetat- oder die Agargelelektrophorese durchführen, können die Lipoproteinelektrophorese mit den schon zur Verfügung stehenden Geräten und teilweise Reagenzien, durchführen.

8.4. Methoden, bei denen die Lipoproteinmuster leicht archiviert werden können:

Dafür ist die Celluloseacetat- und die Agarosegel-Methode am besten geeignet. Die Haltbarkeit dieser Lipoproteinmuster ist ausgezeichnet.

Schlecht haltbar sind die Acrylamid-Disc-Gele. Will man mit dieser Methode Lipoproteinmuster archivieren, so ist man gezwungen, sie sofort nach der Elektrophorese zu photographieren.

8.5. Methoden, die eine gute Trennung der β - und der prae- β -Bande ermöglichen.

Dabei bringt die Papierelektrophorese die schlechtesten Ergebnisse.

Eine gute Trennung und Darstellung der β -und der prae- β -Bande wird durch die Agarosegel-und die Cellulose-acetatelektrophorese erreicht.

Die schärfsten Banden erzielt man jedoch mit der Disc-Elektrophorese. Dabei muß man aber zusätzliche Banden, die zwischen der β -und der prae- β -Bande auftreten, in Kauf nehmen. Erst wenn diese Banden genau definiert worden sind, kann diese Methode, als die Beste angesehen werden.

Tabelle 1:

Lipoproteine des menschlichen Serums:

Fraktion	S _f	Dichte- klasse (g/ml)	Apolipo- proteine	Molekül- durchm. (Angström)	Cholest. (o/o)	Phospho- lipide (o/o)	Triglyceri- de (o/o)	Protein- anteil (o/o)	Konzen- tration (mg/100 ml)
Chylo- mikronen	> 400	< 1,006	A, B, C	700	2-12	3-15	79-95	0,5	0
Pre- β	200-400	< 1,006	A, B, C	300-400	10-24	14-24	48-67	10-13	150
β	0-20	1,006- 1,063	B, A	200	35	22	10	20-25	425
α	-	> 1,063	A, B	70-100	18	30	Spur	45-55	270

S_f = Flotationskonstante

Cholest = Cholesterin

(69, 84)

Tabelle 2:

Sekundäre Hyperlipoproteinämien

Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V
Alkoholismus	Ernährungsbedingt (ges. Fette Cholest.)	Diabet. Azidose	Alkoholismus	Alkoholismus
Diabet. Azidose	Hypo- Thyreose	Lebererkrankungen (Alpha-Lipoproteine häufig vermindert)	Cushing-Syndrom	Diabet. Azidose
Dysglobulinämien	Idiopath. Hyperkalzämie	Tangier-Krankheit	Diabet. Azidose	Nephrot. Syndrom
Hypo-thyreose	Lebererkrankungen (Alpha-Lipoproteine häufig vermindert)	Autoimmun-krankheiten	Dysglobulinämien	Pankreatitis
Pankreatitis	Nephrot. Syndrom		Gicht	
	Plasmozytom		Glykogenosen	
	Porphyrie		Hypophysenunterfunktion	
			Hypothyreose	
			Idiopath. Hyperkalzämie	
			Lipoidspeicherkrankheiten	
			Pankreatitis	
			Ovulationshemmer	
			Schwangerschaft	
			Autoimmun-krankheiten	

Tabelle 3:

Laufzeiten, Spannungen, Stromstärken, Elektrophoresegeräte

P=Papierelektrophorese

C=Celluloseacetatelektrophorese

A=Agarosegelelektrophorese

Lit.	Laufzeit (Stunden)	Spannung	Stromstärke (mA)	Elektrophorese- gerät
P (80)	16-18	100 V	0,25	LKB-Elektro- phoresegerät
P (19)	2	10V/cm		
P (30)	16	120 V konst.	0,75-1 pro Streifen	Durrum hanging strip cell Spinco Model R Serie D
P (46)	16	120 V konst.		Durrumkammer Beckman München
P (57)	17	95-100 V	2,5-3 für 8 Streifen konst.	Durrumkammer Beckman Instru- ments Inc. Palo Alto Calif.
P (90)	14	4,5 V/cm	(Barbitalp.)	
	16	6,5 V/cm	(TEB-Puffer)	
P (61)	16		5, konst.	Durrumkammer Beckman Model R
	4	230 V konst.		
P (45)	2	220 V konst.	14-17	Durrumkammer Beckman Model R
P (75)	10	120 V	1, pro Streifen	Gerät der Gelman Instrument Company
P (54)	16	110 V	7-8, pro Streifen	Durrum hanging strip cell Spinco Model R Serie D

Lit.	Laufzeit (Minuten)	Spannung (Volt)	Stromstärke	Elektrophorese- -Netzgerät
C (14)	90	150 konst.		Horizont. Elektro- phoresekammer Modell 20 Arthur H. Thomas
C (35)	25 Temp. 20°-22°C	250 konst.	5 mA	Microzone Cell Model R 101 Beckman Instr.
C (72)	90	175 konst.		Gelman Elektro- phoresis chamber Deluxe
C (22)	15	200 konst.	1 mA pro Streifen	Gelman cross channel rapid electrophoresis chamber Gelman Spannungsquelle Heath Kit Spannungs- quelle
C (27)	15	200 konst.		Model R-100 Microzone Elektrophoresezelle Beckman Instr.
C (49)	120 Temp. 20°-22°	150 konst.		Universal Elektro- phoresekammer Typ II Fa Shandon stab. Spannungsgerät Vokam 2541
A (66)	120	250	2 mA/ Plättchen (konst.)	E-C Apparatus Corp- Philadelphia Pennsylvania
A (21)	150	12 V/cm		Gebaut nach Anweisung von C.B.Laurell, Allmänna Sjukhuset, Malmö
A (48)	30	300		LKB Immunelektrophorese- ausrüstung LKB 6800 A
A (76)	90-120	180		UGI-Gerät Desaga Heidelberg
A (100)	90-110	180		UGI-Gerät Desaga Heidelberg mit Kühlblock

Lit.	Laufzeit (Min.)	Spannung	Stromstärke	Elektrophorese- geräte
A (59)	120		22 mA/Pl	
A (89)		200 V		Gelman Elektrophorese- kammer oder Beckman Model R

Tabelle 4:

Vergleichbare Filterpapiere

Whatman 3 MM	(45,61,19,80)
Whatman No 1	(90,46,75,30)
Ederol 208	(80)
Schleicher und Schüll 2043 A	(54,46,57)
Schleicher und Schüll 2043 B	(80)
Munktellpapier No 20/150 (Grycksbo Schweden)	(98)

Tabelle 5:

Pufferlösungen:

P=Papierelektrophorese

C=Celluloseacetatelektrophorese

A=Agarosegelelektrophorese

Puffer	Herstellung	Lit.
TEB-Puffer pH 8,8	Tris 0,05 M EDTA 0,02 M Borsäure 0,07 M	P (90)
TEB-Puffer pH 8,9	Tris 60,5 g/l EDTA 6,0 g/l Borsäure 4,6 g/l vor Gebrauch 5 Tage fest verschlossen bei 4-5°C lagern	P (61,57)
Barbitalpuffer pH 8,6 mit Albumin	0,001 M EDTA-Na Barbitalpuffer pH 8,6, Ionenstärke 0,09-0,1 1% Rinder-oder Human- albumin	P (30,46,75,54)
Barbituracetat- puffer pH 8,6	Na-diäthylbarbiturat 0,05 M Na-acetat 0,075 M HCl 0,006 M	P (90)
Barbitalpuffer pH 8,6 Ionenstärke 0,05	41,2 g Na-Barbiturat, 7,36 g Barbital-und 1,488 g Natriumsalz der Äthylendiamintetraessig- säure in 3,6 l H ₂ O dest. lösen und auf 4 l auf- füllen	C (95)
Barbitalpuffer pH 8,6	20,6 g K-Barbiturat in 149,6 ml 0,1 N HCl lösen und mit H ₂ O dest. auf 1 l auffüllen	C (72)
Veronalpuffer pH 8,6 Ionenstärke 0,07	25,172 g Na-Barbiturat in 180 ml 0,1 N HCl lö- sen und mit H ₂ O dest auf 1,5 l füllen. Nach Kor- rektur des pH-Wertes auf pH 8,6 weiter auf 2l auffüllen.	C (49)
Barbitalpuffer pH 8,6, Ionen- stärke 0,075 = B-2-Fertigpuffer Beckman	15,4 g Na-diäthylbarbi- turat und 2,76 g Diäthylbar- bitursäure in 1 l H ₂ O dest. lösen	C (27)

Puffer	Herstellung	Lit.
Trispuffer pH 8,6	14,1 g Tris 22,6 g Glycin 1,0 g NaCl in 1 l H ₂ O dest. lösen	C (92)
Barbitalpuffer	pH 8,6, Ionenstärke 0,1, 0,001 M EDTA, 1 % Albumin	A (46)
Barbitalpuffer	pH 8,6 0,05 M	A (66,89,59)
Barbitalpuffer	Na-acetat 6,5 g Na-diäthylbarbiturat 8,87 g 5,5-diäthylbarbitursäure 1,13g auf 1 l aqua dest.	A (33)
Barbitalpuffer	Na-Veronal HCl-Puffer pH 8,2, 0,05 M	A (76)
Barbitalpuffer	0,05 M, pH 8,6 2,76 g Diäthylbarbitursäure 15,4 g Na-diäthylbarbiturat in 1,5 l aqua dest. lösen	A (65)
Barbitalpuffer	Veronal-Natriumphosphatpuffer pH 8,2 Ionenstärke 0,05 Serva-Labor Heidelberg	A (100)

Tabelle 6:
Farblösungen:

P=Papiererelektrophorese

C=Celluloseacetatelektrophorese

A=Agarosegelelektrophorese

Farbstoff	Herstellung der Farblösung	Färbedauer
Öl-Rot-O (P)	1,5 l Äthanol abs. 1,0 l H ₂ O 1 gr Öl-Rot-O werden in einen Glaskolben gegeben und unter Rühren bis zum Kochen erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Flüssigkeit ohne Filtration in ein Färbegefäß gefüllt und zwischen 37°C und 40°C aufbewahrt.	4-6 Stunden bei 40°C (30,54,90)
Mischung von Sudanschwarz und Cibablau (P)	40 mg Sudanschwarz und 40mg Ciba-blau (BZL) werden in 120 ml warmen 96 %igem Athanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 10 ml warme 4 %ige Sodalösung hinzugefügt. Die Farbstofflösung wird warm filtriert und das Filtrat wird sogleich zum Färben verwendet. Das Färbegefäß steht in einem wasserbad von 65°C.	(99)
Öl-Rot-O (P)	0,4 g des fest. Öl-Rot-O werden in 1 l 60 %igem Alkohol gekocht und über Nacht unter Rühren auf 33°C abgekühlt. Die Lösung wird bei 33°C gefiltert und im Inkubator bei 33°C aufbewahrt.	18 Stunden bei 30°C (45)

Farbstoff	Herstellung der Farblösung	Färbedauer
Vorfärbe- methode Sudan- schwarz (P)	Äthylen- oder Propylenglycol wird auf 100-110°C erhitzt. Zu 100 ml Flüssigkeit wird 1 g Farbstoff gegeben. 5 Mi- nuten wird die Mischung ge- rührt und anschließend durch ein Whatman Filterpapier Nr.2 gefiltriert. Nach dem Abkühlen wird nochmals gefiltriert. Zu 0,5 ml Serum gibt man 0,1 ml Farb- lösung. Die Mischung läßt man 45 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wird über- schüssiger Farbstoff abzentri- fugiert.	(19)
Vorfärbe- methode Sudan- schwarz (P)	2 Tropfen einer gesättigten Sudanschwarzlösung in einem Dioxan-Propylenglycol-Gemisch (Mischungsverhältnis 1:4) werden zu 0,4 ml des Serumkon- zentrates gegeben. Diese Mischung wird 2-3 Stunden lang im Wasser- bad auf 37°C gehalten und im Kühl- schrank einige Stunden bei 4°C aufbewahrt. Daraufhin wird die Mischung 15 Minuten bei 4 000 U/Min. zentrifugiert, wobei überschüssiger Farbstoff entfernt werden kann.	(80)

Farbstoff	Herstellung der Farblösung	Färbedauer
Vorfärbe- methode Sudan- schwarz (P)	0,1 gr. Sudan-schwarz B wird in 1 ml Äthylacetat gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,9 ml Propylenglycol hinzugegeben. Die Mischung wird gerührt und zentrifugiert, wobei überschüssiger Farbstoff entfernt werden kann. Die Farblösung wird in einer braunen Flasche bei Raumtemperatur (21-24°C) gelagert. Um 0,3 ml Serum anzufärben benötigt man 0,1 ml Farblösung	(57)
Fast Red 7B (Sigma Chem. Co. St. Louis No 63118) (C)	Stammlösung: 7 gr Farbstoff pro 1 l 96 %igem Äthanol. Arbeitslösung: 60 ml der Stammlösung werden mit 40 ml NaOOLsg (75 g/l) verdünnt.	1 Stunde (92)
Öl-Rot-O (C)	0,2 gr Öl-Rot-O werden in 350 ml Methanol aufgeköcht. Es werden 150 ml H ₂ O dest. hinzugefügt. Die Farblösung wird bei Raumtemperatur filtriert und bei 39°C aufbewahrt.	6-7 Stunden bei 37-39°C (13)
Öl-Rot-O (C)	0,8 gr Öl-Rot-O werden zu 1200 ml 95 %igem Äthanol gegeben. 15 Min. läßt man die Lösung stehen. Dann wird sie geschüttelt und es werden 800 ml kochendes H ₂ O dest dazugegeben. Die Mischung wird zum Kochen gebracht, auf 37°C abgekühlt und anschließend unter ständigem Rühren über Nacht bei 37°C im Inkubator gehalten. Am folgenden Tag wird	8-16 Stunden bei 37°C (95)

Farbstoff	Herstellung der Farblösung	Färbedauer
	sie auf 41°C erwärmt und filtriert. Aufbewahrung im Inkubator bei 37°C	
Schiffs Reagenz (C)	1 gr p- Rosanilin (Base) und 1 gr Kaliumdisulfit p.a. werden in 1 N Salzsäure gelöst. Es werden 170 ml H ₂ O dest hinzugefügt. Nachdem man die Lösung 24 Stunden hat stehen lassen, wird 1 gr Aktivkohle hin- zugefügt. Nach 6 Stunden filtriert man. Die Lösung ist bis zu 48 Stun- den im Kühlschrank haltbar.	mindestens 15 Minuten (93,72,34,22, 79,70,63)
Öl-Rot-O (C)	700 ml Methanol, 300 ml H ₂ O dest. und 0,4 gr Öl-Rot-O werden zu- sammen zum Kochen gebracht, auf Zimmertemperatur abgekühlt und ohne Filtern verwendet.	über Nacht (bei 37°C) (27,22,14,49)
Sudan- schwarz B und Ciba 7B (C)	50 mg Sudanschwarz B 50 mg Ciba 7B 30 ml abs. Äthanol 30 ml 1 N NaOH	2-3 Stunden (3)
Sudan- schwarz B (A)	Sudanschwarz B Merek 1387 0,4 gr Äthanol 120 ml Zinkacetat 4 gr H ₂ O dest. 80 ml	2 Stunden (21)
Sudan- schwarz B (A)	0,4 gr Sudanschwarz B werden in 200 ml 60 %igem Äthanol gelöst. Den nicht gelösten Farbstoff läßt man über Nacht sedimentieren. Nach dem Dekantieren wird die Stammlösung mit 60 %igem Äthanol verdünnt.	2 Stunden (wenn die Farb- lösung dauernd in Bewegung ist) (72)

Tabelle 7:

Vergleichbare CAF-Folien:

CAF-Folien	Hersteller	Lit.
Sepraphore III	Gelman Instr. Comp. Ann Arbor Michigan	(14,72,22,27, 49,13)
Celluloseacetat Schleicher und Schüll Nr. 2500	Schleicher und Schüll	(14)
CAF-Streifen	Sartorius Membranfilter GMBH Göttingen	(63,93,13)
Gelatinisierte CAF-Streifen	Cellogel Chemotron Milan	(92)
CAF-Streifen	Shandon Scientific Company Inc. Sewickly Pennsylvania	(13)
Titan III CAF-Streifen	Helena Laboratories Allen Park Michigan	(13)

Tabelle 8:

Agarose:

Agarose	Hersteller	Lit.
Agarose Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories Richmond Calif.	(66)
Agarose Sulfatgeh. 0,42 %	Inst. Biologique Français	(48,21)
Agarose	Seakem	(89)
Instant Gel pH 8,6 Ionenst. 0,05 0,45 % Sulfatgeh.	Serva Werke Heidelberg	(46,76,48,100)
Ionagar Powder No 2	Consolidated Laboratory Inc. Chicago Height 3	(59,65)

Tabelle 9:

Herstellung der Gele:

Agarose	Herstellung	Lit.
Servac-Laborat. Maidenhead Berks.	0,75 Agarose werden mit 50 ml (33) aqua dest. gemischt und aufgeköcht. Die Lösung wird gefiltert und bei 60°C mit 50 ml aqua dest. und 50 ml Stammpuffer versetzt. (siehe Tabelle	)
Seakem-Agarose	0,3 g Agarose werden in 50 ml (89) Barbitalpuffer von pH 8,6 und der Ionenstärke 0,05 aufgeköcht.	
Agarose Serva, Heidelberg	0,8 g Agarose werden in 50 ml (76) aqua dest. im Wasserbad aufgeköcht. Nach Verflüssigung des Gels wird mit einem Na-Veronal-HCl-Puffer von pH 8,2 und der Ionenstärke 0,05 auf 100ml verdünnt.	
Agarose Gel L'Industrie Bio- logique Française S.A.	Agarose (12g/l) in Barbitalpuffer (21) (pH 8,6; Ionenst. 0,05), die mit 2,5 g/l Albumin angereichert ist.	
Agarose Bio-Rad Laboratories Inc. Richmond, Calif.	0,25 g Agarose werden in 50 ml (66) Barbitalpuffer (Ionenstärke 0,05; pH 8,6), geköcht. Die Lösung wird auf 45°C abgekühlt und 1 ml 25 %ige Humanalbuminlösung wird hinzugefügt.	

Agarose	Herstellung	Lit.
Agarosepulver Instant Gel A 08-82 Serva Labor Heidelberg	Instant Gel A 08-82 wird (100) in 100 ml aqua dest. kurz aufgekocht. Zu 50 ml des etwa 40°C warmen, flüssigen Gels wird im Standardverfahren 1 ml einer mit 1 M Trispuffer auf pH 8,2 eingestellten 13,3 %igen Rinder- albuminlösung (Behringwerke Marburg) zugesetzt und gut durch- geschüttelt.	

Tabelle 10:
Probenbereitung:

(66,65)	50 ml Serum werden in ein Wasserbad von 45°C gestellt. Zum Serum werden 25 ul warme Agaroselösung gegeben.
(21)	10 ul Plasma und 10 ml Agarose werden miteinander gemischt (beide Flüssigkeiten bei 45°C)
(46,76)	0,2 ml Serum werden mit 0,2 ml physiol. NaCl verdünnt und mit 0,5 ml flüssiger Agarose (50°C) vermischt. 0,05 ml werden für die Elektrophorese benötigt.
(42)	0,5 ml Serum und 0,25 ml Agaroselösung von 40-45°C werden gemischt. 20 ul der Mischung werden benötigt.

Tabelle 11:

Fixierung

Lit.	Fixierflüssigkeit	Fixierzeit (Min.)
(66)	85 %iger Äthanol, der 5 % Essigsäure enthält	45
(21)	50 %iges Methanol	15
(48)	7 %ige Essigsäurelösung	30
(100)	das Gel wird mit ungefähr 20 ml 2 % iger Essigsäure übergossen	30
(76)	2 % ige Essigsäure	30
(42)	70 % iger Äthanol, der 5 % Essigsäure enthält	40

Tabelle 12:

Trockenzeiten und Temperaturen:

Lit.	Temp.	Zeit
(42)	100-110°C	40 Min.
(48)	50°C	
(66)	85°C	
(21)	60°C	über Nacht
(100,76)	die Gele werden vorsichtig mit feuchtem Chromatographiepapier überdeckt und 2 Stunden unter dem Kaltluftventilator bei Zimmertemperatur getrocknet.	

Tabelle 13:

Elektrophoresezeit, Spannung, Stromstärke:

Elektrophoresezeit	Spannung bzw. Stromstärke	Lit.
60 Minuten	5 mA/Röhrchen	(97)
28 Minuten	5 mA/Röhrchen	(10)
35 Minuten	5 mA/Röhrchen	(32)

Tabelle 14:

Elektrophoresegeräte:

Gerät	Anzahl der Proben, die gleichzeitig untersucht werden können	Maße der Röhrchen:
Acrylophor (87) (Haake Messtechnik GmbH & Co Karlsru.)	8	Länge: 6,5 cm Innendurchmesser: 0,6 cm
Model 1200 (32,10) Quiek-Disc Canalco	12	Länge: 7,5 cm Durchmesser: 0,7 cm
Makrophor Boskamp Gerätebau Hersel	10	Länge: 10 cm Durchmesser: 0,5 cm

Tabelle 15:

Bereitung der Probe bzw. des Probengels:

25 μ l werden mit 0,2 ml Loadinggel vermischt. (10)

200 ml Serum und 100 ml einer 1 %igen Lipid-Grim- (77)
-sonlösung werden 5 Minuten lang miteinander verrührt.
20 Minuten lang wird die Lösung zentrifugiert. 20 ml
des klaren Überstandes werden für die Elektrophorese
benötigt.

0,5 ml Plasma werden mit 0,25 ml einer gesättigten (73)
Sudanschwartz-B-Lösung in Ethanediol gemischt.
(Herstellung der Farblösung: Zu 100 ml des auf 100-110°C
erhitzten Lösungsmittels wird 1 g Farbstoff gegeben. Die
Mischung wird 5 Minuten lang geschüttelt und dann durch
ein Whatman Filter, apier No 2 gefiltert. Nach dem Ab-
kühlen wird nochmals gefiltert.)
Eine Stunde läßt man die Mischung bei Raumtemperatur
stehen und versetzt sie dann mit dem gleichen Vo-
lumen einer 4 % igen Polyacrylamidlösung.

250 mg Sudanschwartz-B und 30 ml abs. Äthanol werden (32)
miteinander gemischt und mit aqua dest. auf ein Vo-
lumen von 100 ml aufgefüllt.
8 Volumenteile des großporigen Gels werden mit einem
Volumenanteil der Farblösung gemischt.
Von dieser Mischung werden 0,2 ml mit 20 μ l Serum
gemischt und für die Elektrophorese verwendet.

Tabelle 16 :

Ergebnisse :

Vergleich von Elektrophoresen mit Kühlung und ohne Kühlung	Vergleich von Elektrophoresen mit und ohne Albuminzusatz im Gel	Vergleich von Elektrophoresen mit Albumin im Puffer (Pfo) und Albumin im Gel	Vergleich einer 0,8% igen und einer 0,58% igen Gelkonzentration	Vergleich von Elektrophoresen ohne Albuminzusatz mit solchen mit Normalalbumin und mit gew. Albumin im Gel (nach Campbell)	Vergleich von Elektrophoresen ohne Albuminzusatz mit solchen mit säulen chromatographisch gereinigtem Albumin im Gel
Es wurden je 48 Proben mit und ohne Kühlung verglichen.	Die Ergebnisse der Elektrophoresen mit Albumin zeigten, daß Albumin die Wanderungsgeschwindigkeit der Liproteine noch weiter verlangsamt.	Während die α -Banden beim Albuminhaltigen Gel verschwinden, sind sie bei Albuminzusatz im Puffer, vorhanden. Die Trennung war dagegen beim albuminhaltigen Puffer am schlechtesten. Außerdem war die Leitfähigkeit des albuminhaltigen Puffers auf etwa die Hälfte des normalen Wertes herabgesetzt, so daß bei einer konstanten Spannung von 175 V eine Laufzeit von 7 1/2 Stunden in Kauf genommen werden mußte.	Die Elektrophorese, die wieder mit Kühlung durchgeführt wurde, dauerte 40 Minuten. Bei der Trennung im verdünnten Gel wurden bisher die besten Ergebnisse erzielt. Die β -Bande setzten sich am klarsten von der praef- β -Bande ab.	Die Gelkonzentration betrug 0,58%. Die Elektrophoresen zeigten mit diesem vorbereiteten Albumin keine wesentliche Verbesserung gegenüber denjenigen, die mit unbehandeltem Albumin im Gel durchgeführt wurden. Wie bei allen Elektrophoresen, die mit Albuminzusatz durchgeführt waren, sind die α -Banden verschwunden. Allerdings ist die Trennung der β - und der praef- β -Bande, gut.	Auch bei einem Vergleich zwischen den Elektrophoresen, die ohne Albuminzusatz im Gel durchgeführt wurden und jenen, die mit säulen chromatographisch gereinigtem Albumin im Gel gemacht wurden, zeigte sich keine wesentliche Verbesserung der Trennung mit dem so vorbereiteten Gel.
Mit Kühlung konnte dabei eine weitest schärfere Trennung der β - von der praef- β -Bande erreicht werden.	Die Trennung der β - und der praef- β -Lipoproteine wurde nicht merklich verbessert.	Die Hälfte des des albuminhaltigen Puffers auf etwa die Hälfte des normalen Wertes herabgesetzt, so daß bei einer konstanten Spannung von 175 V eine Laufzeit von 7 1/2 Stunden in Kauf genommen werden mußte.			
Die durch die Kühlung bedingte geringere Beweglichkeit der Lipoproteine im Gel mit Albumin unkenntlich.	Außerdem wurden die zwei α -Banden im Gel mit Albumin unkenntlich.				
Die längere Trennzeit zur Folge					

Lebenslauf:

Am 30.6.1947 wurde ich als 2. Kind des Gutsverwalters Franz F r a n z und seiner Ehefrau Maria Franz, geborene Hammer, Jugendleiterin, in Esslingen a.N.. geboren.

Nach der Grundschule besuchte ich das Mädchengymnasium Esslingen, wo ich im Herbst 1966 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1966/67 studierte ich an der Technischen Hochschule Physik und Chemie.

Im Sommersemester 1967 begann ich mein Medizinstudium an der Universität München, wo ich im Frühjahr 1968 das Vorphysikum und im Herbst 1969 das Physikum bestand.

Am 22. Dezember 1969 heiratete ich den Diplomphysiker Gerhard T r o s t.

Am 11. Dezember 1972 legte ich an der Universität München das Medizinische Staatsexamen ab.
Vom 1.3.73- 30.10.73 war ich als Medizinalassistentin im Klinikum Rechts der Isar in der Chirurgie tätig.

Seit dem 1.11.73 bin ich in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Böblingen als Medizinalassistentin beschäftigt.

Literaturverzeichnis

1. Adlersberg, D., E.T. Bossak, I.H. Sher and H. Sobotka.
Electrophoresis and monomolecular layer studies with
serum lipoproteins
Clin Chem
1, 18 (1955)
2. Ahrens, E.H., Jr., J. Hirsch, K. Oette, J.W. Farquhar
and Y. Stein.
Carbohydrate-induced and fat-induced lipemia
Trans Assoc Am Physicians
74, 134 (1961)
3. De Beats, J. and W. Lezy.
Improved method for lipoprotein electrophoresis
on cellogel
Clin Chim Acta
32, 142 (1971)
4. Bio - Gram - A Lipoproteinmuster
Agarose Gel - Elektrophorese
Arbeitsanleitung der Fa. Bio - Rad
5. Bürger, M. und O. Grütz
Über hepatosplenomegale Lipoidose mit xanthomatösen
Veränderungen in Haut und Schleimhaut.
Arch Derm Syph (Berl.)
6. Brown, W.V., R.I. Levy and D.S. Fredrickson.
Studies of the proteins in human plasma
very - low - density lipoproteins
J Biol Chem
244, 5687 (1969)

7. Brown, W.V., R.I. Levy and D.S. Fredrickson.
Studies on the proteins of the very low-
density lipoproteins
Fed Proc
28, 666 (1969)
8. Quick - Disc Electrophoresis
General Instructions Canalco
9. Lipoproteinemia Diagnosis Canalco
10. Specific Reagent Kit Instructions Canalco
11. Campbell, J., A.D. Martucci and G.R. Green.
Plasma Albumin as an Acceptor of Free Fatty Acids
Biochem J
92, 183 (1964)
12. Cawley, L.P.
Workshop Manual on Electrophoresis and Immunelectrophoresis

Commission on Continuing Education, Council on Clinical
Pathology, American Society of Clinical Pathologists
Chicago, 1964
13. Charman, R.C. and R.A. Landowne.
Separation of Human Plasmalipoproteins by Electrophoresis on Cellulose Acetate
Anal Biochem
19, 177 (1967)
14. Chin, H.P. and D.H. Blankenhorn.
Separation and quantitative analysis of serum
lipoproteins by means of cellulose acetate
Clin Chim Acta
20, 305 (1968)

15. Chin, H.P. and D.H. Blankenhorn.
On the precision of lipoprotein electrophoresis on
cellulose acetate and its use in the diagnosis of
hyperlipoproteinemia
Clin Chim Acta
18, 239 (1969)
16. Colfs, B. and J. Verheyden.
Electrophoresis and Sudan Black staining of lipo-
proteins on gelatinized cellulose acetate.
Clin Chim Acta
18, 325 (1969)
17. Dangerfield, W.G.
An investigation of serum lipids and lipoproteins
by paper - electrophoresis
J Clin Pathol
8, 132 (1956)
18. Dangerfield, W.G. and J.J. Pratt.
An Investigation of Plasma Lipoproteins
by Polyacrylamide Electrophoresis
Clin Chim Acta
30, 273 (1970)
19. Mc Donald, M.J. and L.P. Ribiero.
Ethylene and Propylene glycol in the pre - staining
of Lipoproteins for electrophoresis
Clin Chim Acta
4, 458 (1959)
20. Durrum, E.L., M.H. Paul and E.R.B. Smith.
Lipid detection in paper electrophoresis
Science
116, 428 (1952)

21. Dyerberg, J. and N. Hjörne.
Quantitative plasma lipoprotein estimation by
agarose gel electrophoresis
Clin Chim Acta
28, 203 (1970)
22. Farber, E.R., M.D. John and M.D. Batsakis.
Lipoprotein Electrophoresis
A Comparison of Cellulose Acetate and Paper Techniques
Am J Clin Pathol
51, 523 (1969)
23. Fasoli, A.
Electrophoresis of serum lipoproteins on
filter-paper
Lancet
28, 106 (1952)
24. Fasoli, A.
Paper electrophoresis of the lipoproteins
of the serum
Bull Soc Ital Biol Sper
28, 603 (1952)
25. Fasoli, A.
Electrophoresis of serum lipoproteins on
filter - paper
Acta Med Scand
145, 233 (1953)
26. Fletcher, M.J.
Introduced by Wilkinson, J.H.
A simple method for the separation of serum
lipoproteins on cellulose acetate
Clin Chem
15, 800 (1969)

27. Fletcher, M.J. and M.H. Styliou.
A Simple Method for Separating Serum Lipoproteins
by Electrophoresis on Cellulose Acetate
Clin Chem
16, 362 (1970)
28. Forster, G.
Zur Klinik und Einteilung der Hyperlipidämien
Med Welt
20, 1553 (1969)
29. Fredrickson, D.S., R.I. Levy and F.T. Lindgren.
A Comparison of Heritable Abnormal Lipoprotein
Patterns as Defined by two Different Techniques
J Clin Invest
47, 2446 (1968)
30. Fredrickson, D.S., R.I. Levy and R.S. Lees.
Fat transport in lipoproteins - an integrated
approach to mechanisms and disorders
N Engl J Med
276, 34, 94, 148, 215, 273 (1967)
31. Fredrickson, D.S. and R.S. Lees.
A system for phenotyping hyperlipoproteinemia
Circulation
31, 321 (1965)
32. Frings, C.S., L.B. Foster and P.S. Cohen.
Electrophoretic Separation of Serum Lipoproteins in
Polyacrylamide Gel
Clin Chem
17, 111 (1971)
33. Mc Glashan, D.A.K. and T.R.E. Pilkington.
A method of lipoprotein electrophoresis using agarose gel
Clin Chim Acta
22, 646 (1968)

34. Gottfried, S.P., J.B. Akerson and S. Di Mauro.
Serum - beta - lipoproteins of normal, atherosclerotic
and lipemic individuals.
Changes in concentration, stability and mobility upon
incubation at 6,5° and 37,5° as determined by paper
electrophoresis
Clin Chem
1, 253 (1955)
35. Grabner, W., W. Gronauer, G. Berg und D. Bergner.
Mikrolipidelektrophoresen auf Celluloseacetatfolien
Clin Chim Acta
28, 299 (1970)
36. Greten, H.
Die primären Hyperlipoproteinämien
Munch Med Wochenschr
115, 639 (1973)
37. Greten, H.
Fettstoffwechselstörungen, ihre Erkennung und
Behandlung
G. Schettler
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971
38. Gustafson, A., P. Alaupovic and R.H. Furman.
Studies of the composition and structure of serum
lipoproteins. Separation and characterization of
phospholipid-protein residues obtained by partial
delipidization of very low - density lipoproteins
of human serum
Biochem J
5, 632 (1966)
39. Hartmann, G.
Helv Med Acta
34, Suppl. 47 (1967)

40. Houtsmuller, A.J.
The Application of Reinagar for the quantitative
Separation of alpha and B-Lipoproteins
Clin Chim Acta
2, 497 (1964)
41. Houtsmuller, A.J.
Agarose - Gel - Electrophoresis of Lipoproteins
A clinical screening test
Assen 1969
42. Hulley, S.B., S.G. Cook, W.S. Wilson, M.Z. Nichaman, F.T. Hatch
and F.T. Lindgren.
Quantitation of serum lipoproteins by electrophoresis
on agarose gel:
Standardization in lipoprotein units (mg/100ml)
by comparison with analyt. ultracentrifugation
J Lipid Res
12, 420 (1971)
43. Immarino, R.M., M. Humphrey and P. Antolik.
Agar Gel Lipoprotein Electrophoresis
A Correlated Study with Ultracentrifugation
Clin Chem
15 No 12, 1218 (1969)
44. Irwin, W.C. and D.J. Campbell.
Ultracentrifugation and electron microscopic
characterization of human serum lipoproteins
as separated by agarose gel electrophoresis
Clin Chem
14, 790 (1968)
45. Jencks, W.P. and E.L. Durrum.
Paper electrophoresis as a qualitative method:
The staining of serum lipoproteins
J Clin Invest
34, 1437 (1955)

46. Kahlke, W. und G. Schlierf.
Ein Vergleich von Papierelektrophorese und Agarose-
gelelektrophorese
Zur Differenzierung von Hyperlipoproteinämien
Klin Wschr
46, 330 (1967)
47. Karlson, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Thieme Verlag Stuttgart
S. 52, 54 (1967)
48. Kindler, U.
Lipoproteinelektrophoresen in Agarosegel
Med Klin
66, 639 (1971)
49. Klemens, U.H. und J. Schmalbeck.
Lipoprotein - Elektrophorese auf Celluloseacetat-
- Membranen
Z Klin Chem Klin Biochem
Jahrgang 69 Heft 5
50. Lee, D.M.
Physical, chemical and immunochemical characterization
of human plasma low density lipoproteins
Dissertation
Oklahoma 1967
51. Lee, D.M. and Alaupovic, P.
Studies of the composition and structure of plasma
lipoproteins
Isolation, composition, and immunological characteri-
zation of low density lipoprotein subfractions of
human plasma
Biochemistry
9, 2244 (1970)

52. Lees, R.S. and Fredrickson, D.S.
The Differentiation of Exogenous and Endogenous
Hyperlipemia by Paper Electrophoresis
J Clin Invest
44, 1968 (1965)
53. Lees, R.S. and D.S. Fredrickson.
Use of Paperelectrophoresis in the Diagnosis and
Study of Hyperglyceridemia
Circulation
30, Suppl III, 20 (1964)
54. Lees, R.S. and F.T. Hatch.
Sharper separation of lipoprotein species by paper
electrophoresis in albumin - containing buffer
J Lab and Clin Med
61, 518 (1963)
55. Levy, R.I. and D.S. Fredrickson.
Diagnosis and management of hyperlipoproteinemia
Am J Cardiol
22, 576 (1968)
56. Lewis, L.A.
Screening for Serum Lipoprotein Abnormalities -
- Comparison of Ultracentrifugal, Paper and Thin-
-Layer Techniques
Lipids
4, 60 (1969)
57. Lewis, L.A.
Electrophoretic determination of serum lipoproteins
(Prestaining technique)
Cleveland Clinic Ohio 44 106

58. Lloyd, M.
Symposium der Holländischen Kardiologischen
Gesellschaft 1973
Lipid Metabolism and Atherosclerosis
Treatment of Children with Antilipemic Drugs
59. Lopez, A.S., R. Sathanur, Srinivasan, Fortune
A. Dugan, B. Radhakrishnamurthy and Gerald, S. Berenson.
Detection of subtle abnormalities of serum B- and
pre B-lipoproteins in "normal" individuals by
turbimetric and electrophoretic methods
Clin Chim Acta
31, 123 (1971)
60. Maurer, H.R.
Disc Electrophoresis
Walter de Gruyter
Berlin 1971
61. Moinuddin, M. and L. Taylor.
Serum Lipoproteins. A paper Electrophoresis
Method without Albumin in the Buffer
Lipids
4, 186 (1969)
62. Narayan, K.A., S. Narayan and F.A. Kummerow.
Disc electrophoresis of human serum lipoproteins
Nature
205, 246 (1965)
63. Nikkari, T. and J. Viikari.
Anomalous mobilities of Lipoproteins in
Cellulose acetate microelectrophoresis
Clin Chim Acta
24, 473 (1969)

64. Nikkilä, E.A.
Distribution of lipids in serum protein fractions
separated by electrophoresis in filter paper
Ann Med Exp
30, 331 (1952)
65. Noble, R.P.
Electrophoretic separation of plasma lipoproteins
in agarose gel
J Lipid Res
9, 693 (1968)
66. Noble, R.P., F.T. Hatch, J.A. Mazrimas, F.T. Lindgren,
L.C. Jensen and G.L. Adamson.
Comparison of Lipoprotein Analysis by Agarose
Gel and Filter Electrophoresis with Analytical
Ultracentrifugation
Lipids
4, 55 (1969)
67. Oncley, G.L., K.W. Waltan, P.G. Cornwell.
A rapid method for the isolation of β -lipoproteins
from human plasma
Am Clin Soc
79, 4666 (1957)
68. Ornstein, Davis US Patent 3,384,564
69. Papenberg, J. Piper, W. und Knobloch, I.
Charakterisierung von menschlichen Serumlipopro-
teinen mittels Gelfiltration auf Agarose
Fresenius Zeitschrift für Analyt. Chemie
252, 248 (1970)

70. Peyer, Ch. und H.P. Rieder.
Technische und nomenklatorische Probleme der
Lipoproteinelektrophorese und Normalbereiche
der Glyco- und Lipoproteine im Serum
Clin Chim Acta
30, 295 (1970)
71. Pezold, F.A.
Lipide und Lipoproteide im Blutplasma
Springer Verlag
1961 S. 47
72. Postma, T.U. and J.A.P. Stroes.
Lipid Screening in Clinical Chemistry
Clin Chim Acta
22, 569 (1968)
73. Pratt, J.J. and W.G. Dangerfield.
Polyacrylamide Gels of Increasing Concentration
Gradient for the Electrophoresis of Lipoproteins
Clin Chim Acta
23, 189 (1969)
74. Pries, C., C.M. Van Gent, H. Baes, M.K. Polano, H.A.M.
Hulsman and A. Querido.
Primary hyperproteinemia:
The clinico - chemical classification of the
most common types.
Clin Chem Acta
19, 181 (1968)
75. Pykovokakis, G., J. Hatzioannou and C. Gardikas.
Modification of the electrophoretic separation
of lipoproteins on paper
J Clin Pathol
24, 68 (1971)

76. Rapp, W. und W. Kahlke
Lipoprotein - Elektrophorese in Agarosegel
Clin Chim Acta
19, 493 (1968)
77. Raymond, S., J. L. Miles and J. C. J. Lee.
Lipoprotein Patterns in Acrylamidelectrophoresis
Science
151, 346 (1966)
78. Ressler, N., R. Springate and J. Kaufman.
A method of lipoprotein electrophoresis
J Chromatog
6, 409 (1961)
79. L. A. Rosati, M. D., E. R. Napier, Jr., Ph. D., and
J. G. Batsakis, M. D.
Laboratory Note
Identification of Type III Hyperlipoproteinemia by
electrophoresis on Cellulose acetate and indirect
(Schiff's) staining
Clin Biochem
3, 171 (1970)
80. Rovescalli, A.
Die Papirelektrophorese der Lipo- und Glyco-
proteine mit konzentriertem Serum
Clin Chim Acta
7, 139 (1962)
81. Schettler, G.
Innere Medizin Band 2
Georg Thieme Verlag Stuttgart
1972 S. 370
82. Schwandt, P.
Die sekundären Hyperlipoproteinämien
Munch Med Wochenschr
115, 644 (1973)

83. Seidel, D.
Plasmalipoproteine
Biochemische und klinische Aspekte
Munch Med Wochenschr
115, 613 (1973)
84. Seidel, D., A. Schmitt und P. Alaupovic,
Ein abnormes Low - density - Lipoprotein bei
Cholestase
Dtsch Med Wochenschr
95, 1805 (1970)
85. Shore, B., V. Shore.
Heterogeneity in protein subunits of human serum
high-density lipoproteins
Biochemistry
7, 2773 (1968)
86. Shore, V., B. Shore.
Some physical and chemical studies on two poly-
peptide components of high-density lipoproteins of
human serum
Biochemistry
7, 3396 (1968)
87. Shore, B., V. Shore.
Isolation and characterization of polypeptides of
human serum lipoproteins
Biochemistry
8, 4510 (1969)
88. Siegenthaler, W.
Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag Stuttgart
S. 128 (1973)

89. Sirtori, C., K.M. Hassanein, R. Hassanein and B.M. Boulos.
Phenotyping of Type II and III Hyperlipoproteinemias
A simple quantitative agarosegel lipoprotein
electrophoresis
Clin Chim Acta
31, 305 (1971)
90. Sonnino, F.R. and P.P. Gazzaniga.
Electrophoretic subfractions of human serum
lipoproteins by use of TEB buffer
Clin Chim Acta
6, 295 (1961)
91. Swahn, B.
A Method for Localisation and Determination
of serum Lipids after Electrophoretical Separation
on filter paper
Scand J Clin Lab Invest
5, 98 (1952)
92. Vergani, C., G.L. Rho, M. Vannotti and G. Vecchi.
Electrophoresis of Plasma Lipoproteins on
Gelatinized Cellulose Acetate
Clin Chem
17, 551 (1971)
93. Voggel, K.H. und D. Harms.
Verbesserte Arbeitsverfahren für die Cellulose-
acetatelectrophorese
GIT Fachz. Lab.
16, 3 12. Sonderheft Labormedizin (1972)
94. Wieme, G.
Studies on Agar Gel Electrophoresis
Arscia Bruxelles 1959

95. Winkelman, J., F.A. Ibbott, C. Sobel and D. Wybenga.
Studies on the Phenotyping of Hyperlipoproteinemias
Evaluation of cellulose acetate technique and
comparison with paper electrophoresis technique
Clin Chim Acta
26, 33 (1969)
96. Winkelman, J., Donald, R. Wybenga and Frank A. Ibbott.
Phenotyping of Hyperlipoproteinemias
Effect on Electrophoretic Pattern of Serum Storage
at Ambient, Refrigerator, or Freezing Temperatures.
Clin Chem
16, 507 (1970)
97. Wollenweber, J. und W. Kahlke.
Vergleichende Untersuchungen der Lipoproteine
des Serums mit der Agarosegel - Elektrophorese und
der Disk - Elektrophorese in Polyacrylamidgel.
Clin Chim Acta
29, 411 (1970)
98. Wunderly, Ch und F.A. Pezold.
Über die Bindung von Fettfarbstoffen an die
einzelnen Serumproteinfraktionen
Eine Anwendung der präparativen Papierelektrophorese
Z Gesamte Exp Med
120, 613 (1953)
99. Wunderly, Ch. und S. Piller.
Die Färbung der im Blutserum enthaltenen
Proteine, Lipide und Kohlenhydrate nach Papier-
elektrophorese
Klin Wschr
32, 425 (1954)

100. Zöllner, N., W. Gröbner, Ch. Berger und G. Wolfram.
Elektrophoretische Trennung der Serumlipoproteine
im Agarosegel
Z Klin Chem Klin Biochem
2, 525 (1969)

Die eigenen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden im Sommer 1972 im Fettstoffwechsellabor der 1. Med. Klinik der Universität München ausgeführt.

Herrn Privatdozent Dr.med. S c h w a n d t danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, für die Anleitung zu dieser Arbeit, sowie für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Auch möchte ich mich bei Ihm für die großzügige Überlassung der Laborgeräte und die Bereitstellung der Chemikalien bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei allen Med.Techn.Assistentinnen des Fettstoffwechsellabors, insbesondere bei Frau R. H a l s n e r , für Ihre hilfreiche Unterstützung, bedanken.

Nicht zuletzt bin ich Herrn Privatdozent Dr.med. M. K n e d e l für seine Ratschläge und seine Hilfe in Bezug auf die Disk-Elektrophorese großen Dank schuldig.

